

POISSON REGRESSION MODEL IN EPIDEMIOLOGY - AN INTRODUCTION

Stefano Parodi¹, Ezio Bottarelli²

PAROLE CHIAVE:

regressione di Poisson, epidemiologia, rischio relativo, rapporto tra tassi, studio di corte.

KEY WORDS:

Poisson regression, epidemiology, relative risk, rate ratio, cohort study.

Riassunto

Il modello di regressione di Poisson rappresenta una metodologia statistica impiegata per descrivere un conteggio in funzione di un insieme di predittori. Negli ultimi due decenni è stato ampiamente utilizzato sia in Epidemiologia umana che veterinaria in studi di incidenza e mortalità di patologie croniche. Tra le sue numerose applicazioni, il modello di Poisson è stato soprattutto impiegato per confrontare coorti di esposti e di non esposti e per valutare il decorso clinico di soggetti ammalati.

La presente review fornisce una descrizione del modello di regressione di Poisson nell'ambito dello studio di coorte prospettica, che costituisce la base concettuale della maggior parte delle indagini epidemiologiche. Inoltre vengono illustrate alcune semplici strategie di modellamento statistico per ottenere stime di rischio relativo tra gruppi di esposti e di non esposti, al netto dell'effetto di variabili estranee (confondimento), oppure per testare la presenza di interazione tra una variabile di esposizione e un altro fattore (denominato "modificatore d'effetto"). Infine viene fornita una breve descrizione di alcuni studi di Epidemiologia Veterinaria, in cui tale modello è stato applicato.

Summary

The Poisson regression model is a technique used to describe count data as a function of a set of predictor variables. In the last two decades it has been extensively used both in human and in veterinary Epidemiology to investigate the incidence and mortality of chronic diseases. Among its numerous applications, Poisson regression has been mainly applied to compare exposed and unexposed cohorts and to evaluate the clinical course of ill subjects.

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

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

This review provides a description of the Poisson regression in the framework of the prospective cohort study, which represents the conceptual ground of most epidemiological investigations. Furthermore, some strategies of modelling are illustrated, which allow to obtain estimates of relative risk between exposed and unexposed individuals, adjusted for the effect of extraneous variables (confounding), or to assess the presence of an interaction between an exposure variable and another factor ("effect modifier"). Finally, a short description of some veterinary epidemiology studies, which have applied the Poisson regression model, is provided.

Introduction

Poisson regression analysis is a technique which allows to model dependent variables that describe count data (4, 10). It is often applied to study the occurrence of small number of counts or events as a function of a set of predictor variables, in experimental and observational study in many disciplines, including Economy, Demography, Psychology, Biology and Medicine (8). In particular, in the last twenty years, Poisson regression model has been extensively applied in many context in biomedical studies, including Epidemiology, to investigate the occurrence of selected diseases in exposed and unexposed subjects in observational prospective studies, or to evaluate the clinical course of patients in experimental and observational investigations in human clinical setting.

The Poisson regression model may be used as an alternative to the Cox model for survival analysis, when hazard rates are approximately constant during the observation period and the risk of the event under study is small (*e.g.*, incidence of rare diseases). For example, in ecological investigations, where data are available only in an aggregated form (typically as a count), Poisson regression model usually replaces Cox model, which cannot be easily applied to aggregated data. Furthermore, using rates from an external population selected as a referent, Poisson regression model has often been applied to estimate standardized mortality and incidence ratios in cohort studies and in ecological investigations (3, 7). Finally, some variants of the Poisson regression model have been proposed to take into account the extra-variability (overdispersion) observed in actual data, mainly due to the presence of spatial clusters or other sources of autocorrelation (4).

Besides medical studies, the Poisson regression model has been used in different fields of veterinary research, ranging from herd management assessment to animal health in domestic and wild animals and control of infectious diseases in different animal species. The Poisson model has been applied also to data analysis in a multidisciplinary study on cancer incidence in veterinary and other workers of veterinary industry compared to that of other part of active population in Sweden (16). The most recent applications of the Poisson model and of its variations (*e.g.*, negative binomial model, Poisson random effect model, Poisson model with autocorrelation terms, etc.) in veterinary medicine are aimed to evaluate: the effect of anthelmintic treatment with eprinomectin at calving on milk production in dairy herds with limited outdoor exposure (14); the periparturient climatic, animal, and management factors influencing the incidence of milk fever in grazing systems in cows (13); the effects,

both positive and negative, of widespread badger culling programs on *Mycobacterium bovis* tuberculosis in cattle in Britain (6); the seasonality of equine gastrointestinal colic (2).

In spite of its recent wide application, Poisson regression model remains partly poor known, especially if compared with other regression techniques, like linear, logistic and Cox regression models.

The aim of this paper is to introduce the Poisson regression model in the framework of the prospective (cohort) studies, which are the conceptual ground of most other epidemiological investigations. Controlling for confounding and the assessment of interaction will be briefly illustrated. Finally, some applications of Poisson model in veterinary epidemiology will be presented and discussed.

An outline of the cohort study design

In the framework of the epidemiologic observational investigations, cohort (or follow-up) study is considered as the main analytical study, in that it allows:

- a) to observe the onset of selected diseases after the exposure to specific risk factors has occurred;
- b) to obtain precise measures of exposure time;
- c) to estimate the association between exposure and risk of developing specific diseases, by comparing groups (sub-cohorts) of exposed and unexposed individuals (3, 9).

The importance of the cohort study in observational Epidemiology derives to the fact that such a study design represents the investigation which more resembles to an experiment (9). As briefly indicated in the Introduction, a cohort study design is often applied also to experimental investigations, for example to evaluate the efficacy or the side effects of medications and other treatment interventions.

On the basis of the criteria employed for the selection ("recruitment") of the subjects to be included in the group under study ("cohort"), some different types of cohorts studies may be defined; the main ones are the close cohort and the open cohort (3, 9).

In a closed cohort design, the individuals are completely identified in a specific (ideal) instant time and the main factors of interest for the outcome (*e.g.*, exposures for healthy individuals and different types of medical interventions in clinical studies) are usually measured at the same time. All the subjects are followed up for the same period (called "follow up time" or, simply, "follow up"), as illustrated in the diagram in Figure 1. In a closed cohort design, the follow-up period usually corresponds to a calendar period.

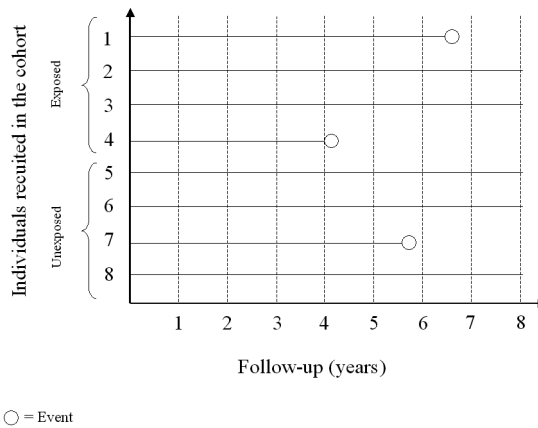


Figure 1: Explanatory example of a closed cohort study design

In a closed cohort, each subject may leave the study only either because the end of the study itself (*e.g.*, individuals 2 and 3 in the exposed sub-cohort and individuals 5, 6 and 8 in the unexposed sub-cohort) or due to the occurrence of the event of interest (individuals 1 and 4 in the exposed sub-cohort and individual 7 in the unexposed sub-cohort, respectively). In this situation, the probability of the occurrence of the event under investigation may be directly estimated at specific time points by the corresponding frequency observed. Such a probability, conditional to the observation time, represents a central estimator of event occurrence in epidemiological investigations and it is called Risk. For example, the risk for the exposed group in Figure 1, estimated for the whole follow up (*i.e.*, 8 years) is 0.5 (or 50%), because 2 out of 4 subjects experienced the event during this period. In the unexposed sub-cohort, the corresponding risk is 25%. The ratio between such estimates is called Relative Risk (RR) and is employed as a measure of an association between the occurrence of an exposure and the probability of the disease onset. In the above illustrated example $RR = 2$, suggesting that the exposed have a risk twice than the unexposed to develop the disease under study. On average, RR will tend to 1 if no association between the exposure and the risk exists, and will be higher, the higher the effect of the exposure is. A value between 0 and 1 will be observed for factors inversely associated to the risk (which should be more correctly called “protective factors”, instead of “exposures”).

In Figure 1 it is also evident the general dependence of risk and RR from the observation time. In fact, for example, if the follow up have been stopped after 6 years, a risk of 25% would have been observed in both sub-cohorts, leading to an RR estimate of 1.0. It would be noted that Risk and RR are pure numbers, *i.e.*, they are dimensionless.

In an open cohort, a subject may withdraws before the end of follow up for factors other than the occurrence of the event under study, for example: migration to other areas (subject “lost to follow up”) or death due to causes different from the

disease of interest. In this case the corresponding observation time is “censored” (and its occurrence is named “censoring”). A schematic example of an open cohort is illustrated in Figure 2.

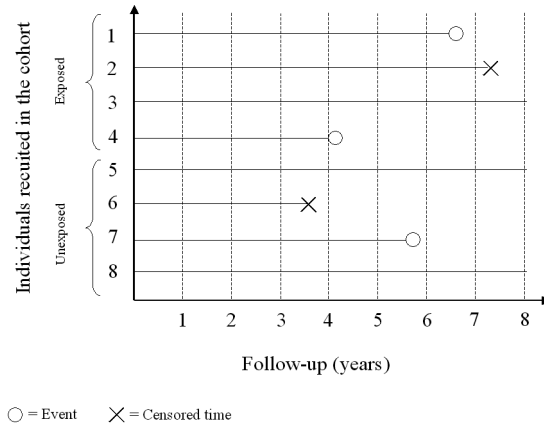


Figure 2: Explanatory example of an open cohort study design

A particular, but very common kind of open cohort is the dynamic cohort, made by a group whose composition may change during the follow up time. For example, in most occupational cohorts, people are in general hired and they usually retire at different times. An example of a dynamic cohort is illustrated in Figure 3.

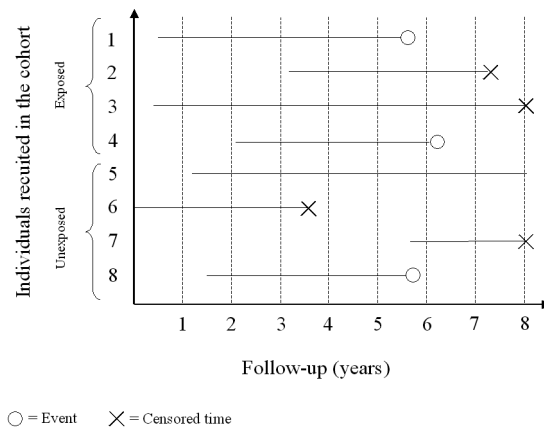


Figure 3: Explanatory example of a dynamic cohort study design

As above stated, in this paper dynamic cohort will be considered as a particular case of an open cohort, because in many cases the subjects belonging to the cohort may be considered as they were ideally observed starting from the same instant time. Subjects that have not experienced the event of interest may be considered as censored, as illustrated in Figure 4, in which the same subjects of the dynamic cohort in Figure 3 are referred to the same ideal starting time.

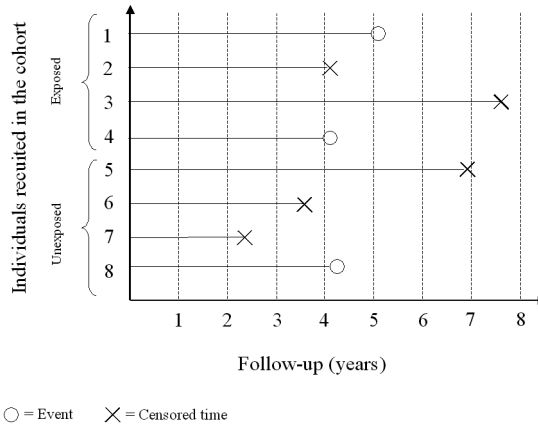


Figure 4: Example of a dynamic cohort (data from Figure 3), analyzed as an open cohort study, shifting the starting point of observation of each subject to the same ideal zero time.

In general, the presence of censoring prevents from directly obtaining risk estimates, because the follow up time is different among the subjects that do not have experienced the outcome. RR estimates may be obtained by some different ways in an open cohort study. One of the most important is by using another fundamental measure of occurrence in Epidemiology, *i.e.*, the rate.

Measures of occurrence in cohort studies: risk and rate

The definition of rate may be derived from the general relationship linking the risk to the follow up time, which has been demonstrated in a previous paper (12):

$$R = 1 - e^{-\int^{\lambda(t)} dt} \quad (1)$$

Variable λ represents the rate of the outcome onset in the cohort and it may be considered as a measure of the “speed” of their occurrence. In many instances, especially for rare diseases in observational cohorts, λ may be considered approximately as a constant. Moreover, when the rate is small (e.g., about one event per 10^{-3} - 10^{-5} persons per year) the following useful approximation may be applied:

$$R \cong \lambda \cdot t \quad (2)$$

The relationship between risk and rate, according to equation (1), is displayed in Figure 5. It may be noted that for low values of λt , according to equation (2) such an association may be approximately considered as linear. λ represents a mean rate, while $\lambda(t)$ represents an instant rate, often called hazard rate.

λ may be estimated by the ratio between the observed events O and the corresponding sum of follow up times m , named “person-time at risk”.

$$\hat{\lambda} = \frac{O}{\sum_{i=1}^N t_i} = \frac{O}{m} \quad (3)$$

More precisely, such a ratio in equation (3) represents the Maximum Likelihood Estimate of λ under the hypothesis of an exponential probability function for the distribution of the observational time (*i.e.*, the follow-up time) (11). Such distribution directly derives from the (1) under the assumption of a constant rate during the observation period t .

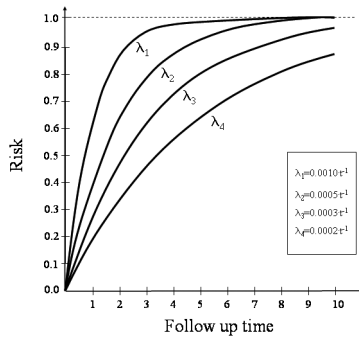


Figure 5: Risk trend as a function of follow-up time and rate

According to equation (2), an RR estimate may be obtained by the corresponding rate ratio as follows:

$$\hat{RR} = \frac{\hat{\lambda}_1}{\hat{\lambda}_2} \quad (4)$$

where λ_1 and λ_2 represent the rates estimated in the exposed and unexposed sub-cohorts, respectively, by applying equation (3).

Variability of rates and Poisson distribution

The variability of a rate estimate and the comparison between rates need some assumptions about the probability distribution, which is assumed to generate the observed rates. In most studies, the variability of the estimate of the at risk population may be considered as negligible and only the numerator of equation (3) (*i.e.*, the observed events) contributes to the rate variability. When rare events are considered, a Poisson distribution may be assumed:

$$P(O) = \frac{\mu^O e^{-\mu}}{O!} \quad (5)$$

where μ is an unknown parameter, that may be estimated by the observed events O . In the Poisson distribution function, parameter μ represents both the expected number of events and the variance of their estimate. Accordingly, the variance of an estimate of a rate may be obtained as follows:

$$V\hat{ar}(\hat{\lambda}) = V\hat{ar}\left(\frac{O}{m}\right) = \frac{O}{(m)^2} = \frac{\hat{\lambda}}{m} = \frac{\hat{\lambda}^2}{O} \quad (6)$$

Variability of a rate ratio and statistical inference

Under the null hypothesis of no association between the outcome (events) and the factor under study (exposure, medications, etc.), an RR estimate may be assumed to follow approximately a log-normal distribution with expected value of 1. Accordingly, statistical inference about a rate ratio may be performed by the estimate of the variance of its logarithm, which needs the separate estimate of the variance of the two rates:

$$V\hat{ar}\left[\log\left(\frac{\hat{\lambda}_1}{\hat{\lambda}_2}\right)\right] = V\hat{ar}\left[\log(\hat{\lambda}_1)\right] + V\hat{ar}\left[\log(\hat{\lambda}_2)\right] \quad (7)$$

Applying the Delta method, as illustrated in a previous paper (12), such estimate may be obtained by the following equation:

$$V\hat{ar}(\log(\hat{\lambda})) = \frac{1}{O} \quad (8)$$

Under the hypothesis of a log-normal distribution of the estimate of a parameter theta, related confidence intervals at a specified $1-\alpha$ value may be obtained as follows:

$$\left[\hat{\theta} \cdot e^{\mp z_{\alpha/2} \cdot \sqrt{\widehat{Var}[\log(\hat{\theta})]}} \right] \quad (9)$$

Applying equations (9), (8) and (7), confidence intervals of an RR estimate, obtained via a rate ratio, may be obtained by the following equation:

$$\left[\frac{\hat{\lambda}_1}{\hat{\lambda}_2} \cdot e^{\mp z_{\alpha/2} \cdot \sqrt{\frac{1}{O_1} + \frac{1}{O_2}}} \right] \quad (10)$$

where O_1 and O_2 are the observed events in the two sub-cohorts and $Z_{\alpha/2} = 1.96$ for $\alpha=0.05$ (useful to obtain 95% confidence intervals).

Table 1 shows an example of a hypothetical observational cohort study aimed at evaluating the association between an exposure and the risk of developing a specific disease.

Table 1: Results of a hypothetical observational cohort study.

Exposure	Number of Cases	Person - years
Exposed	108	44870
Unexposed	51	21063

In the exposed sub-cohort the estimated rate is:

$$\hat{\lambda}_1 = \frac{108}{44870} = 240.7 \cdot 10^{-5}$$

while the corresponding estimate for the exposed is:

$$\hat{\lambda}_2 = \frac{51}{21063} = 242.1 \cdot 10^{-5}$$

Finally, the estimate of RR is:

$$\hat{RR} = \frac{\hat{\lambda}_1}{\hat{\lambda}_2} = \frac{242.7 \cdot 10^{-5}}{240.1 \cdot 10^{-5}} = 0.99$$

From equation (10) the related 95% confidence interval of the estimated RR will be:

$$\left[0.99 \cdot e^{\mp 1.96 \sqrt{\frac{1}{108} + \frac{1}{51}}} \right] \longrightarrow [0.71; 1.4]$$

The confidence interval includes the expected value under the null hypothesis of no effect of the association (*i.e.*, RR=1), then in the cohort under study no evidence emerges of an association between the exposure and the risk of the disease onset ($p > 0.05$). A similar result may be obtained by the Poisson regression model.

Rate ratio estimate via Poisson regression model

As above briefly illustrated, the numerator of a rate for a rare disease may be considered as a realization of a Poisson variable with an unknown parameter μ . As a consequence, the relation between the rate and the variable under study (*e.g.*, exposures or treatments) may be investigated by a Poisson model, which is a regression model belonging to the GLM class (Generalized Linear Models) (4, 5).

$$g \left[E(Y | \underline{\beta}, \underline{x}) \right] = \beta_0 + \beta_1 x + \dots + \beta_p x_p \quad (11)$$

where:

$$P(Y | \underline{\beta}, \underline{x}) = \frac{\mu^Y e^{-\mu}}{Y!}$$

and g is called “the link function”.

In most applications, the natural logarithmic is employed as link function, to avoid negative expected values, that make no sense if the response variable is a counting (number of events). Because in the cohort studies the variable of interest is a rate, whereas equation (11) is referred to a counting (*i.e.*, the numerator of the rate), it is necessary to include a constant term in the model, representing the logarithm of the

at risk person-times. Such a constant term in GLM is called Offset and corresponds to another variable with a coefficient of 1. As outlined by Kleinbaum *et al* (10), using the above described modelling, which is the log-linear Poisson regression, is almost equivalent to use the more common linear regression model with the logarithm of the rate as the response variable. However, Poisson regression model has the advantage to allow the modelling of rates even in the presence of some subgroups containing zero observations (whose corresponding rate is zero and the corresponding log-rate does not exist in the space of real numbers). Moreover, linear regression model assumes the same variance for the rates within each group under study (homoscedastic assumption) which is rarely met in actual cohort data (10).

Controlling for confounding in cohort studies

As illustrated for the case-control study in a previous publication (12), in most epidemiological investigations it is necessary to check for the presence of variables that, if associated both to the risk and to the factors under study, may induce a bias in the estimate of association, as the RR. Such variables are called “confounders” and the phenomenon is known as “confounding” (9).

A simple example of confounding by a dichotomic variable (gender) is illustrated in Table 2, using the same data reported in aggregated form in Table 1.

Table 2: An example of confounding in an observational cohort study

a) All individuals (pooled cohort)			b) Stratum 1 - Males			c) Stratum 2 - Females		
	N. of Cases	Person- years		N. of Cases	Person- years		N. of Cases	Person- years
Exposed	108	44870	Exposed	30	3218	Exposed	78	41652
Unexposed	51	21063	Unexposed	44	11699	Unexposed	7	9364
$\hat{RR}_T = 0.99$ (0.71;1.4)			$\hat{RR}_1 = 2.5$ (1.6;3.9)			$\hat{RR}_2 = 2.5$ (1.2;5.4)		

The occurrence of confounding emerges when the RR estimate for the total (pooled) cohort differs from the corresponding RR within the categories (strata) of the alleged confounder. However, if at least one RR is different from RR_T , but it/they also differ from one another, an interaction between the alleged confounder (that in that case should be properly named “effect modifier”) and the exposure will occur, as illustrated in a further paragraph.

In Epidemiology, distinguishing between confounding and effect modifying (interaction) is central. In fact, in general, the occurrence of confounding is not

interesting for the researcher, whereas the interaction may represents an important phenomenon from a bio-medical point of view.

In the presence of confounding it is convenient to make a common estimate of effect of the exposure across the strata of the confounder and to estimate the related confidence intervals. Such a task may be performed by the log-linear Poisson regression model.

Controlling for confounding by Poisson regression model

Let suppose to apply a log-linear Poisson regression model to data from a cohort study, using the number of observed events as response variable, a binary (dummy) variable E for the exposure (coded 0 in the absence and 1 in the presence of exposure), a confounding variable C (binary or expressed on a continuous scale), and the logarithm of the person-years at risk as offset. Predicted values of the model will be:

$$\log(\hat{\lambda}) = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 E + \hat{\beta}_2 C \quad (12)$$

The expected value of λ for the exposed sub-cohort (E=1) will be:

$$\log(\hat{\lambda} | E = 1) \equiv \hat{\lambda}_1 = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_2 C(E = 1) \quad (13)$$

and the corresponding estimate for the unexposed (E=0) will be:

$$\log(\hat{\lambda} | E = 0) \equiv \hat{\lambda}_0 = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_2 C(E = 0) \quad (14)$$

Subtracting equation (14) from (13) and assuming a similar value for the confounder C, *i.e.*, $E(C=0) = E(C=1)$:

$$\log \hat{\lambda}_1 - \log \hat{\lambda}_0 = \hat{\beta}_1 \quad (15)$$

from which:

$$e^{\hat{\beta}_1} = \frac{\hat{\lambda}_1}{\hat{\lambda}_0} = \hat{RR} \quad (16)$$

Then, a common RR estimate across the strata of the confounding variable, *i.e.* an RR estimate adjusted for confounding, may be obtained from a Poisson regression model like (12) by exponentiating the estimate of the exposure coefficient β_1 .

Confidence intervals for RR may be obtained by the Wald method, using the standard error of β_1 and assuming an approximated normal distribution for such coefficient:

$$95\%IC(RR) = \left[\hat{RR} \cdot e^{\mp 1.96 \cdot ES(\beta_1)} \right] \quad (17)$$

The Box 1 reports on the output of the STATA for Windows statistical package (version 7.0) concerning data shown in Table 1, analyzed by a Poisson regression model. Stata command line is highlighted in bold type font. After *poisson* command the number of events (the response variable) is indicated and only one predictor (*Exp*, *i.e.* the exposure variable) is included in the model. After the comma, the option *e* (*PersYears*) states that the log of the variable containing the at risk person-times (*PersYears*) is included as offset. Finally, the option *irr* requires to display an estimate of RR and the related 95% confidence intervals (obtained by exponentiating the coefficient of each predictor and the related 95% confidence limits, respectively).

```

. poisson Events Exp, e(PersYears) irr

Iteration 0: log likelihood = -43.045095
Iteration 1: log likelihood = -42.624204
Iteration 2: log likelihood = -42.622776
Iteration 3: log likelihood = -42.622776

Poisson regression                                Number of obs   =           4
                                                    LR chi2(1)      =           0.00
                                                    Prob > chi2      =          0.9720
                                                    Pseudo R2       =          0.0000

Log likelihood = -42.622776

-----
Events |          IRR      Std. Err.      z    P>|z|     [95% Conf. Interval]
-----+-----
Exp |          .9940507    .1688924    -0.04   0.972     .7125029     1.386853
PersYears | (exposure)
-----

```

Box 1

The first part of the output reports on the number of iterations needed to achieve the convergence (*i.e.*, to obtain maximum likelihood estimates of coefficients).

Some information is provided about the goodness-of-fit of the model, as the log-likelihood, the likelihood ratio test (indicated as LR chi2) and the pseudo-R2. Such statistics are not illustrated in this introductory paper.

Finally, a table with the estimate of RR is shown. The RR for the exposure is 0.99 with 95% confidence interval (obtained by the Wald method): [0.71;1.39]. This finding is in good agreement with the estimates obtained by the Delta method, reported above (Table 2, Part A).

Including the variable Sex in the model, an estimate of RR adjusted for the effect of the confounder is easily obtained, as illustrated in the Box 2.

. poisson Events Exp Sex, e(PersYears) irr		
Iteration 0:	log likelihood =	-10.534428
Iteration 1:	log likelihood =	-10.437675
Iteration 2:	log likelihood =	-10.437624
Iteration 3:	log likelihood =	-10.437624
Poisson regression		
Log likelihood = -10.437624		
Number of obs =		4
LR chi2(2) =		64.37
Prob > chi2 =		0.0000
Pseudo R2 =		0.7551

Events	IRR	Std. Err.

Exp	2.486049	.5042256
Sex	.2004278	.0380404
PersAnno	(exposure)	

	z	P> z

	4.49	0.000
	-8.47	0.000

	[95% Conf. Interval]	

	1.67058	3.699578
	.1381667	.2907452

Box 2

The RR estimate is now 2.5 with the corresponding 95% confidence interval which does not include the value of 1, indicating that after adjusting for the effect of the confounder, an effect of the exposure emerges. As expected, results are in good agreement with those obtained by the “manual” computation, reported in Table 2 (Part B and Part C).

It may be noted that, acting as a confounder, variable Sex is statistically significantly associated with the outcome of interest (disease rate). Because males are the referent category, the corresponding RR estimate (0.20) indicates that females have a risk of developing the considered disease lower than males.

Effect modifying in cohort studies

When a variable interacts with the exposure (or with the treatment in clinical experimental studies), an effect modifying occurs and the phenomenon is also called “interaction”. As above briefly stated, interaction may be highlighted by different values of the estimated RR across the strata of the variable acting as effect modifier. Differently from confounding, researchers cannot estimate an RR adjusted for the effect of such a variable, because different RR exist across the strata.

A simple example of interaction between a variable of exposure and an effect modifier, both expressed on a dichotomic scale, is provided in Table 3.

Table 3: Example of effect modifying or interaction in an observational cohort study

A) All individuals (pooled cohort)			B) Stratum 1 - Males			C) Stratum 2 - Females		
	N. of Cases	Person- years		N. of Cases	Person- years		N. of Cases	Person- years
Exposed	391	769309	Exposed	189	478383	Exposed	202	290926
Unexposed	119	358341	Unexposed	78	242043	Unexposed	41	116298
$\hat{RR}_T = 1.5$ (1.2;1.9)			$RR_1 = 1.2$ (0.94;1.6)			$RR_2 = 2.0$ (1.4;2.8)		

In the pooled cohort (Table 3, part A), an association between the exposure and the risk of the disease onset seems to emerge, the corresponding RR being statistically significantly higher than 1, as it is evident from the corresponding 95% confidence interval which does not include such a value. However, after stratifying by gender (Table 3, part B and C, respectively), different RR emerge comparing males and females (RR=1.2 and RR=2.0, respectively). In conclusion, data in Table 3 suggest an interaction between sex and exposure, indicating that females are probably more susceptible than males to the exposure effect.

Looking for interaction by Poisson regression model

In the presence of interaction, separated estimate of RR by each group (stratum) of the effect modifier should be produced. However, different RR may be observed, especially in small cohorts, simply due to the sample variability. To check for the presence of interaction, some formal statistical tests have been developed, including the use of Poisson regression models with (at least) one interaction variable among the predictors.

$$\log(\hat{\lambda}) = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 E + \hat{\beta}_2 M + \hat{\beta}_3 EM \quad (18)$$

where M is the effect modifier and E is the exposure, both considered as binary variables for didactic purposes.

The two RR estimates in each M stratum may be obtained by the (18), in fact, when M=0:

$$\log(\hat{\lambda}|M=0) = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 E \rightarrow \hat{RR}(M=0) = e^{\hat{\beta}_1} \quad (19)$$

and when M=1:

$$\log(\hat{\lambda}|M=1) = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 E + \hat{\beta}_2 + \hat{\beta}_3 E \rightarrow \hat{RR}(M=1) = e^{\hat{\beta}_1 + \hat{\beta}_3} \quad (20)$$

It may be noted that when $\hat{\beta}_3$ equals 0, the two RR estimates by M stratum are equals, then M cannot be considered as an effect modifier. As a consequence, interaction may be checked testing the statistical significance of the $\hat{\beta}_3$ coefficient by some test commonly employed in GLM (Likelihood ratio, Wald or Score test).

The Box 3 reports on the results of a Poisson regression model with an interaction term, obtained by Stata statistical package applied to the data in Table 3.

```

. xi: poisson Events Sex Exp i.Sex*i.Exp, e(PersYears)

Iteration 0:  log likelihood = -13.032551
Iteration 1:  log likelihood = -12.989877
Iteration 2:  log likelihood = -12.989856
Iteration 3:  log likelihood = -12.989856

Poisson regression                                Number of obs   =          4
                                                    LR chi2(3)      =         48.79
                                                    Prob > chi2     =         0.0000
Log likelihood = -12.989856                        Pseudo R2       =         0.6525

-----+-----
Events |      Coef.   Std. Err.      z    P>|z|     [95% Conf. Interval]
-----+-----
Sex    |   .0898228   .1929009     0.47   0.641    - .288256   .4679016
Exp    |   .2037419   .134579     1.51   0.130    - .0600282   .467512
_IsexXExp_1 | .4740406   .2178354     2.18   0.030    - .0470911   .9009902
_cons  |  -8.040162   .1132277    -71.01   0.000    -8.262084   -7.81824
PersYears | (exposure)
-----+-----

```

Box 3

The *xi:* statement, placed before *poisson* command, asks Stata package to insert a new dummy variable in the model (indicated as the product by Sex and Exp), which represents the variable for the interaction between the alleged effect modifier (*Sex*) and the exposure variable (*Exp*). Wald test (indicated in Stata output as *z*, with the related statistical significance indicated as *P > |z|*) is statistically significant (*p* = 0.030) indicating that an interaction has occurred. As a consequence, separated estimates of RR would be computed by Sex, as reported in the Box 4 and Box 5. As expected, results are consistent with those reported in Table 3 (Part B and Part C for Males and Females, respectively).

```

. * RR estimate for Males

. poisson Events Exp if Sex == 1, e(PersYears) irr

. poisson Events Exp if Sex == 0, e(PersYears) irr

Iteration 0:  log likelihood = -6.6386349
Iteration 1:  log likelihood = -6.6386143
Iteration 2:  log likelihood = -6.6386143

Poisson regression                                Number of obs   =          2
                                                    LR chi2(1)      =         2.35
                                                    Prob > chi2     =         0.1249
Log likelihood = -6.6386143                        Pseudo R2       =         0.1506

-----+-----
Events |      IRR   Std. Err.      z    P>|z|     [95% Conf. Interval]
-----+-----
Exp    |   1.225982   .1649914     1.51   0.130    - .941738   1.596018
PersYears | (exposure)
-----+-----

```

Box 4

```

. * RR estimate for Females

. poisson Events Exp if Sex == 2, e(PersYears) irr

Iteration 0:  log likelihood = -6.3616538
Iteration 1:  log likelihood = -6.3512432
Iteration 2:  log likelihood = -6.351242
Iteration 3:  log likelihood = -6.351242

Poisson regression                                Number of obs   =          2
                                                    LR chi2(1)      =         18.05
                                                    Prob > chi2     =         0.0000
                                                    Pseudo R2      =         0.5870

Log likelihood = -6.351242

-----+-----
Events|          IRR   Std. Err.      z    P>|z|    [95% Conf. Interval]
-----+-----
Exp   |  1.969506   .3373593    3.96  0.000    1.407841    2.755248
PersYears| (exposure)
-----+-----

```

Box 5

Some examples of the application of the Poisson regression model in veterinary epidemiology

To illustrate the application of the Poisson regression model on actual data in veterinary epidemiology, we will briefly describe three investigations selected from the scientific literature.

In the first study, Andreasen *et al* (1) carried out a prospective cohort study to evaluate the association between the time elapsed from seroconversion to slaughter and the extent of lung lesions in 830 pigs in Denmark. Examination of thoracic organs at slaughter is commonly used for surveillance and estimation of the economic burden or respiratory disease in pigs. Moreover, longitudinal serological testing allows to estimate at which age seroconversion occurs in herds infected by *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* and has been proposed to be associated with the severity of the disease in a previous investigation (15). To evaluate the association between the extent of lung lesions at slaughter and the time elapsed since seroconversion, the Authors recruited 830 pigs from 8 herds and checked for seroconversion by ELISA test every 3 weeks until slaughter. The time elapsed from seroconversion to the death was categorized in 4 groups and considered as the main factor of interest (*e.g.*, similarly to an exposure factor in other cohort studies). The number of lung lesions was modelled by a log-linear Poisson regression model, including the main factor of interest and the following possible confounders: gender, age at slaughter and litter. Moreover, interaction terms between litter and any each other predictor were inserted into the model. A negative relationship between the time elapsed from seroconversion to *M. hyopneumoniae* and mycoplasma-like catharral pneumonia emerged in each herd. Such an association was expressed as mean change percent (MCP) for each 4-week interval elapsing from seroconversion. Such a parameter was easily estimated by the corresponding estimate of the coefficient β_1 in the Poisson regression model (see equation 12) by the following formula:

$$MCP = (e^{\hat{\beta}_1} - 1) 100$$

Another study (13) investigated the role of climatic factors on the risk of developing milk fever in grazing cows. Milk fever is a metabolic disorder due to a drop in blood calcium (Ca) concentration, especially occurring in the period between the late pregnancy and the early lactation. Apart from nutritional factors, which are known to be associated to the risk of developing this disease, many other variables, including climatic ones, are suspected to play some role on its incidence. Some indirect evidence came from study on metabolic disorders in sheep, whereas only few studies in bovine had been conducted before, and they did not include dairy cows. The Authors analyzed the relationship by the number of milk fever episodes and many climatic factors (relative humidity, screen temperature, soil and grass temperature, wind, sunlight, rainfall, etc.) by a log-linear Poisson regression model, using the logarithm of the number of days at risk as the offset. All the predictors were categorized on the quintiles distribution, except for rainfall which had a high frequency of 0 values and was categorized using 0 rainfalls as the first category and other four strata based on the quartiles of the remaining data. Effect of variables recorded at individual (*i.e.*, the cow) level were analyzed by another model (Generalized Estimated Equation, GEE), which is out of the scope of this paper. Univariable Poisson regression analysis revealed an association between evaporation, difference between maximum and minimum screen temperature and rainfall in the previous 48h. Results from multivariable analyses confirmed these effects.

Finally, Travier et al (16) investigated the risk of cancer among male veterinarians in Sweden. Veterinarians are exposed to many carcinogens (radiation, pesticides, anaesthetics, zoonotic viruses), but previous studies about the risk of this occupational group were rare, and based on mortality data only. The Authors identified a large cohort of male veterinarians or workers in veterinary industry, using data from the Swedish Cancer Environment Registry III, which collects information about two Swedish national population censuses (in 1960 and in 1970), the National Register of Causes of death and the Swedish Cancer Registry. The follow up period ranged between 1 January 1971 and 31 December 1989. A total of 1178 subjects (701 veterinarians and 477 other workers) were recruited and classified according the relevant code of occupation or industry. They were categorized into three groups: a) veterinarians working in the veterinary industry; b) veterinarians in other industries; c) workers other than veterinarians in the veterinary industry. The rest of Swedish male population, after the exclusion of subjects working at an extensive contact with animals (*i.e.*, breeders, hunters and butchers), was considered as the unexposed sub cohort. The number of incident cancer cases was modelled as a function of the exposure and of many confounders (namely, five-year age groups, four-year calendar periods, residence regions and urbanization level) by a log-linear Poisson regression model. A reanalysis restricting the unexposed group to persons with a high socioeconomic level was also performed. An excess risk of melanoma was observed in all the three groups (RR = 2.77, 1.84 and 3.12 in group a, b and c, respectively). The first group experienced an excess risk of colon cancer (RR = 2.36, 95%CI: 1.42-3.91), which was not observed in the other two groups, and an excess risk of esophageal (RR = 3.78, 95%CI: 1.42-10.09), pancreatic (RR = 2.10, 95%CI: 0.94-4.68), and brain (RR = 2.51, 95%CI: 1.04-6.03) cancer, which was present also in the group b,

but not in the group c. Finally the group c (not veterinarians) experienced an excess risk of prostate cancer and, even if not significant, of oral and stomach cancer and of multiple myeloma. Analysis restricted to the high socio-economic level confirmed the excess risk for melanoma, esophageal, colon, pancreatic and brain cancer among veterinarians.

References

1. Andreasen M, Mousing J, Thomsen LK. (2001) No simple association between time elapsed from seroconversion until slaughter and the extent of lung lesions in Danish swine. *Preventive Veterinary Medicine*, 52:147-61.
2. Archer D.C., Pinchbeck G.L., Proudman C.J., Clough H.E. (2006) Is equine colic seasonal? Novel application of a model based approach. *BMC Veterinary Research*, 2: 27.
3. Breslow NE, Day NE. (1987) *Statistical Methods in Cancer Research*, Vol. 2, The Design and Analysis of Cohort Studies (IARC Scientific Publications No. 82), Lyon (Fr), IARC.
4. Cameron AC, Trivedi PK. (1998) *Regression analysis of count data*. Econometrics Society Monographs No. 30. Cambridge University Press. Cambridge (UK).
5. Dobson AJ. (2002) *An introduction to generalized linear models*. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton (Florida).
6. Donnelly C.A, Woodroffe R., Cox D.R., Bourne F.J., Cheeseman C.L., Clifton-Hadley R.S., Wei G., Gettinby G., Gilks P., Jenkins H., Johnston W.T., Le Fevre A.M., McInerney J.P., Morrison W.I. (2006) Positive and negative effects of widespread badger culling on tuberculosis in cattle. *Nature*, 439(7078):843-6.
7. Estève J, Benhamou E, Raymond L. (1994) *Descriptive Epidemiology*. IARC Scientific Publications No 128, Lyon (Fr).
8. Gardner W, Mulvey EP, Shaw EC (1995). Regression analyses of counts and rates: Poisson, overdispersed Poisson and negative binomial models. *Psychological Bulletin*, 118(3):392-404.
9. Kleinbaum DG, Kupper LL, Morgentern H. (1987) *Epidemiologic Research*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
10. Kleinbaum DG, Kupper LL, Muller KE, Nizam A. (1998) *Applied regression analysis and other multivariable methods - Third Edition*. Brooks/Cole Publishing Company, Duxbury Press, Pacific Grove (CA).
11. Newman SC. (2001) *Biostatistical methods in Epidemiology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
12. Parodi S., Bottarelli E. (2005) Control for confounding in case-control studies. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma*, XXV, 14-46.
13. Roche J.R., Berry D.P. (2006) Periparturient climatic, animal, and management factors influencing the incidence of milk fever in grazing systems. *Journal of Dairy Science*, 89(7): 2775-83.
14. Sithole F., Dohoo I, Leslie K., DesCoteaux L., Godden S., Campbell, J.,

- Keefe G., Sanchez J. (2006) Effect of eprinomectin pour-on treatment around calving on reproduction parameters in adult dairy cows with limited outdoor exposure. *Preventive Veterinary Medicine*, 75(3/4): 267-79.
15. Sitjar M, Noyes EP, Simon X, Pijoan C. (1996) Relationship among seroconversion to *Mycoplasma hyopneumoniae*, lung lesions and production parameters in pigs. *Swine Health Prod.* 4(6):273-77.
 16. Travier N., Gridley G., Blair A., Dosemeci M., Boffetta P. (2003) Cancer incidence among male Swedish veterinarians and other workers of the veterinary industry: a record-linkage study. *Cancer Causes & Control*, 14(6): 587-93.

Acknowledgements

Stefano Parodi is a recipient of a grant of the Italian Neuroblastoma Foundation.

PAIN IN THE ANIMALS: DIAGNOSIS, TREATMENT AND PREVENTION

IL DOLORE NEGLI ANIMALI: DIAGNOSI, TRATTAMENTO E PREVENZIONE.

Fabio Leonardi*, Stefano Zanichelli**, Paolo Botti**

KEY WORDS: pain, analgesia.

PAROLE CHIAVE: dolore, analgesia.

Summary

Whoever lives in daily touch with animals is aware of their expression of different feelings, but the impossibility of verbal expression makes their exact identification difficult. The detection of a specific sensation is mainly based on anthropomorphization of animal behavior while the objective evaluation is complicated.

The International Association for the Study of Pain defines pain as “an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage”. Pain is clinically important condition because it impairs life quality of the animal. Besides the relationship between companion animals and their owners in the industrialized world makes the introduction of analgesic therapies indispensable.

In the last decade the use of analgesics has increased thanks to new physiological and pharmacological knowledge for both pain treatment and pain prevention. However, it is still a very difficult field because the different species have different reactions to nociceptive stimuli, show an extreme clinic variability of pain and have different responses to analgesic treatment (1). Besides, a correct method for the objective evaluation of pain has not been set yet (21).

Nowadays pain prevention and analgesic therapy are based on opioids, local anesthetics, α_2 -agonists, ketamine and corticosteroids.

Riassunto

Chi vive quotidianamente a contatto con gli animali può cogliere in loro le manifestazioni di diversi sentimenti, ma l'impossibilità di comunicazione verbale

* Assegnista per la Collaborazione ad Attività di Ricerca

** Professore Ordinario

Sezione di Clinica Chirurgica Veterinaria e Medicina d'Urgenza - Dipartimento di Salute Animale
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Parma

Dott. Fabio Leonardi, Sezione di Clinica Chirurgica Veterinaria e Medicina d'Urgenza,
Via del Taglio n° 8 - 43100 Parma - Tel. 0521/032718. E-mail: fleofvet@hotmail.com

rende difficile la loro esatta identificazione. Il riconoscimento di una determinata sensazione si basa principalmente sull'antropomorfizzazione dei comportamenti animali mentre ardua è la valutazione oggettiva.

L'International Association for the Study of Pain definisce il dolore come “una sensazione sgradevole e un'esperienza emozionale in risposta ad un insulto tissutale reale o potenziale, o descritto in questi termini”. Il dolore è una condizione clinicamente importante poiché condiziona negativamente la qualità della vita dell'animale. Inoltre, il rapporto esistente tra gli animali da compagnia e loro proprietari nel mondo industrializzato rende indispensabile l'introduzione di terapie analgesiche.

Nell'ultimo decennio vi è stato un incremento nell'utilizzo degli analgesici grazie alle nuove conoscenze fisiologiche e farmacologiche sia per il trattamento sia per la prevenzione del dolore. Tuttavia, è ancora un campo irto di difficoltà poiché le varie specie trattate hanno reazioni diverse agli stimoli nocicettivi, manifestano un'estrema variabilità clinica semeiologica del dolore e hanno differenti risposte ai trattamenti analgesici (1). Inoltre non è ancora stato messo a punto un metodo corretto per la valutazione oggettiva del dolore (21).

Attualmente la prevenzione del dolore e le terapie analgesiche si basano su oppioidi, anestetici locali, $\alpha 2$ -agonisti, ketamina, anestetici locali e corticosteroidi.

Pain definition

Pain is “an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage” (10). Pain is a complex phenomenon based on pathophysiological and psychological components often difficult to recognized and interpret in the animals.

The term “suffering” is used in association with the term “pain” to mean a conscious acceptance of pain.

The nociception is the captation, the transduction and the transmission of the harmful stimulus. When nociceptors are stimulated by a thermic, mechanic or chemical insult, they transmit the impulse to the central nervous system (CNS) for interpretation and modulation. Pain is a sensorial and emotional answer to a nociceptive stimulus which is unique for each individual and variable for different factors: species (in dogs, working breeds bear pain better than toy breeds), age (youngsters have a lower pain tolerance threshold), sex and health condition (sick animals have a lower pain tolerance threshold than healthy ones, but a lower reactive capability to pain).

It is common opinion that, if a procedure is painful for man it is painful for animals too, but the pain caused by an insult is not always the same (1).

Pain role

Pain has a protective role in order to minimize the tissue damage. Through pain animals learn notions on their environment and acute pain makes them modify their behavior and prevent further damage. Pain can also be a destructive stimulus because can cause behavior, metabolic and functional disorders sometimes lethal.

Pain treatment and prevention are a key objective of veterinary profession.

Besides, it has been proved that analgesic treatments help recovery because (16) (26):

- cardiac and respiratory frequencies are kept on more physiological values facilitating respiratory exchanges (pain reduces the removal of the respiratory tree secretions) and the cardiovascular apparatus functionality. Therefore, all parts of body will be well vascularized and also the damaged areas will receive an adequate supply of oxygen and nutrients;
- cicatrization is facilitated;
- metabolism is improved (pain can cause lactic acidosis and increase of protein catabolism);
- animals begin earlier to eat and drink regularly;
- stress is minimized, catecholamines cortisol and glucose release is reduced, therefore animals will sleep regularly;
- diffidence, vocalizations and aggressiveness are reduced, easing man-animal relationship;
- self-harming behavior is reduced;
- earlier deambulation will allow the animal to urinate and defecate;
- urination and defecation are qualitative and quantitative more regular.

Pain identification

Pain stimulus is to be related to its location. Morbid processes related to eye, teeth, nose, ears, muscle-skeletal apparatus, vertebrae, thorax and perineum are extremely painful. Pain responses are enough species-specific. Thus to be able to distinguish a normal from a non-normal behavior in a specific species is fundamental (1). Following some behavioral examples typical of pain, even if not all of them are pathognomonic considering the extreme variability correlated to the species (12), are reported:

- modification of physiological parameters (common to all animal species): increase of cardiac frequency, blood pressure, respiratory frequency, body temperature, cardiac arrhythmia, superficial respiration, mucosa paleness due to vasoconstriction mediated by catecholamines, mydriasis, scialorrea;
- increase of blood concentration of glucose, catecholamines and corticosteroids;
- personality change (a quiet animal might become aggressive and vice versa);
- vocalization: it is not a very specific and sensitive indicator and must not be the only parameter for pain evaluation;
- stillness: preys are inclined to hide themselves in silence not to show weakness to their predator;
- to lick, to bite, to scratch or to jolt the aching area to the point of self-harming;
- change in deambulation: lameness or dragging of the aching limb;
- change in posture: abdomen contraction and kyphosis;
- change in movement;
- reduction of appetite and thirst with consequent weight loss and dehydration;
- facial expressions: dimmed eyes, expanded pupils, photophobia, ear move-

ments;

- excessive sweating: horses;
- excessive salivation: rodents;
- oculonosal discharge: stressed rats produce a lachrymal porphyrin pigment and they look like bleeding from the their nose and eyes;
- teeth grinding: ruminants and rodents;
- variations in defecation (tenesmus, diarrhea) and urination (dysuria).

Pain score

In the past pain quantification in animals was exclusively based on subjective parameters that varied significantly according to the observer experience (9). The methods used for pain evaluation consisted of objective scales used for pain evaluations in children and adapted to the animal model.

These included (14):

- “single descriptive scale” (SDS): it is the simplest method; four or five expression are used to quantify pain (e.g.: no pain, light, moderate or severe pain) and to each of them a number (pain score) is assigned (e.g.: no pain = 0, light pain = , etc.); it does not permit intermediate evaluations associated to small modifications following pain stimuli;
- “visual analogue scale” (VAS): it is composed from a line of 100 mm whose ends are equivalent to “absence of pain” and “pain that could not be more intense” (17); the observer marks the millimetric line in correspondence to the pain intensity; the distance between the end “absence of pain” and the mark is the “pain score”; it is characterized by considerable subjective variations of the observers but, not being based on fixed categories it is more sensitive than NRS and SDS;
- “numerical rating scale” (NRS): it is similar to VAS, but the observer, instead of marking pain score on a line, gives a score (from 0 to 10 and from 0 to 100) which is the “pain score”; it does not improve data precision, but makes the results organization and analysis easier.

There are also scales, based on behavioral responses classification, more accurate and with a better correlation with clinic conditions and prognosis. The “Glasgow Coma Scale” (GCS) quantifies with a score, based on clinical observations, the damage to conscience.

In 1985 it has been created a scale for the evaluation of postoperative pain in newborn: the CHEOPS that has been used in the dog as well (“Children’s Hospital of Eastern Ontario Pain Scale”, table 1). This method has shown some limits too:

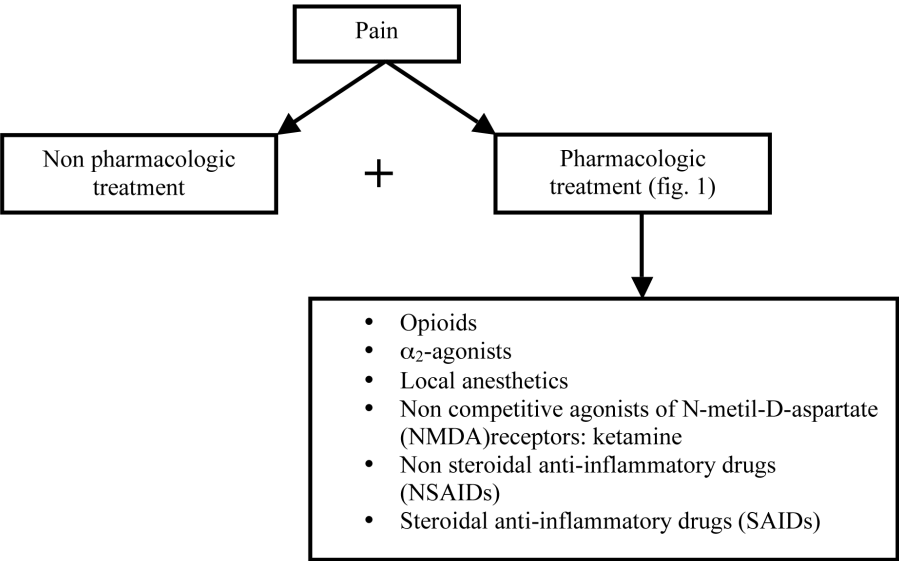
- observed behavior can be heterogeneous and not reflect the pain actually felt;
- vocalization can be the expression of fear and post-anesthetic dysphoria;
- postural reflexes, sensorial depression or poor activity are not always correlated to a corresponding pain degree.
- mental status is conditioned from the dog character (aggressiveness, dominance).

Category	Description	Score
<i>Physiological parameters</i>		
a	Physiological parameters within normal range	0
b	Expanded pupils	2
c (1 response only)	Heart rate percentual increase	
	> 20%	1
	> 50%	2
	> 100%	3
d (1 response only)	Respiratory rate percentual increase	
	> 20%	1
	> 50%	2
	> 100%	3
e	Rectal temperature higher than physiological range	1
f	salivation	2
<i>Response to palpation</i>		
(1 response only)	No reaction	0
	Reacts/watches when stimulated	1
	Reacts/watches before stimulation	2
<i>Activity</i>		
(1 response only)	Resting	
	-semiconscious	0
	-awaken	1
	eats	0
	Walks continuously, stands and sits	2
	Rolling over, strikes continuously	3
<i>Mental status</i>		
(1 response only)	docile	0
	friendly	1
	diffident	2
	aggressive	3
<i>Posture</i>		

a	Watches and protects the harmed area (foetal position)	2
b (1 response only)	Lateral decubitus	0
	Sternal decubitus	1
	Sitting or standing with upright head	1
	Standing with reclined head	2
	movements	1
	Abnormal postures (i.e. pray position)	2
<i>Vocalizations</i>		
(1 response only)	No vocalizations	0
	Vocalizes when touched	2
	Intermittent vocalizations	2
	Continuous vocalizations	3

Table 1: CHEOPS. The scale includes 6 categories which contain the description of different behaviors to which a score is assigned. The minimum score is 0 and the maximum 27.

Pain treatment



Scheme 1: pain treatment takes account of a non pharmacologic component associated to therapies based on the use of different principles, by themselves or in association.

Non pharmacologic treatment

It consists of all what improves the animal surrounding environment providing a feeling of tranquility (23).

- keeping the animal dry and clean;
- keeping the animal warm (woolen and thermal blankets, thermal pads, infrared light);
- keeping the environmental temperature at about 20°C and humidity at 30-70%;
- avoiding loud and abrupt noise;
- avoiding environment too bright;
- providing human contact;
- caressing and cuddling the animal: stroking the animal head or ears may stimulate A β nervous fibers which seems to be able to reduce the nociceptive impulse transmitted by A δ and C fibers;
- rocking the animal: relaxes animal stimulating the otoliths (11).

In the last few years special attention has been dedicated to the nutraceuticals, non pharmacologic substances which play an important role in the strengthening of body tissues, helping the recovery of damaged tissues and improving metabolism. A diet daily adding of nutraceuticals improves many dogs life quality. Essential fatty acids ($\Omega 3$ e $\Omega 6$) are the nutraceuticals most commonly used. It has been demonstrated that also glucosamine, chondroitin sulphate, methylsulfonylmethane linseed oil may contribute to reduce the pain caused by arthritis. It seems that adding these elements to diet might slow down age related degenerative processes. In order to ease the algic symptomatology pain, nutraceuticals must be taken for at least 6-8 weeks.

Pharmacologic treatment

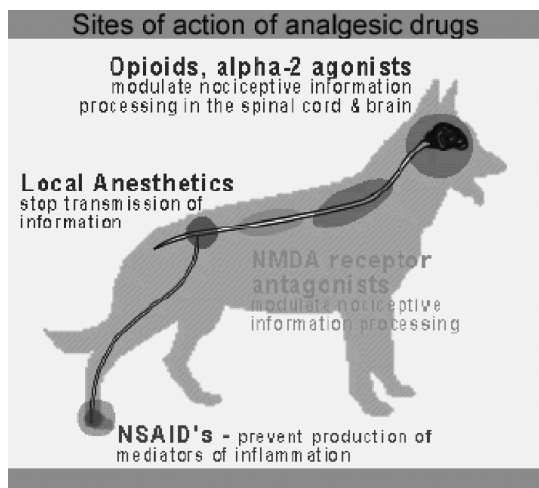


Figure 1: site of analgesic action

Opioids

The term opioid refers to all the compounds that bind to specific opioid receptors. Their analgesic action doesn't go along with loss of consciousness if not at high doses. They act at three levels:

- dorsal horn: inhibition of transmission;
- sovraspinal: inhibition of somatosensorial afferents;
- descending inhibitory paths: activation.

There are 4 types of opioid receptors:

- μ : sovraspinal analgesia, respiratory depression, bradycardia, sedation;
- κ : spinal analgesia, sedation;
- δ : modulation of μ receptors;
- σ (classification still in doubt): excitation, breathing stimulation, tachycardia, don't have psychomimetic effects.

Opioids are classified basing on their interaction with the receptors in (20)

(23):

- agonists (morphine, meperidine, fentanyl, sufentanyl, alfentanyl, carfentanyl, codeine, etorphine, hydromorphone, oxymorphone, methadone): they bind to all receptors of opioids causing all the effects correlated; they provoke analgesia, respiratory depression, sedation and addiction;
- agonists-antagonists (pentazocine, butorphanol, nalbuphine, bremazocine, dezocine): they bind to κ receptors, but are antagonists of μ receptors; they are indicated for light to moderate pain, but not for the intense one;
- partial agonists (buprenorphine, nalorphine): they bind to receptors μ , activating them only partially but providing an excellent analgesia with reduced collateral effects;
- antagonists (naloxone, naltrexone, nalmefene): antagonize all effects of μ and κ receptors.

Opioids can be administered by parenteral, oral, trans-dermal or epidural route (23).

1. Parenteral route. It is most commonly used for the immediate post-operative pain (23). It can be used the percutaneous, the intramuscular and the endovenous route (the latter provides a quicker analgesia, but may cause histamine release following mastocytes degranulation). Doses vary from species and administration route.

2. Os. It is useful to manage postoperative pain, but bioavailability for most opioids is only 20-30% (for codeine is 60%).

3. Transdermal route. It is limited to administration of fentanyl because it is highly liposoluble and, therefore, can be absorbed through dermis. Commercially transdermal fentanyl band-aids are available for human use, and they have been used successfully in the dog and the cat for chronic pain treatment. Fentanyl band-aids provide a stable analgesia level for 3-5 days. In the dog blood peak is reached after 24 hours and stay stable for 3 days, while in the cat an excellent analgesia is reached after only 4-8 hours which lasts for 5 days. It is obvious that it would be better to place the band-aid the day before surgery. The application area of the band-aid is the dorsal region of the neck. The area must be clipped, clean, dry and the band-aid must

adhere to the skin. It is appropriate to bandage the neck and label the bandage so everybody knows that there is a fentanyl band-aid underneath. In case the therapy should be extended, the band-aid can be substituted with another one placed in a different spot. Band-aids are formulated depending on their release in $\mu\text{g}/\text{hour}$. There are four formulations: 25 $\mu\text{g}/\text{hour}$, 50 $\mu\text{g}/\text{hour}$, 75 $\mu\text{g}/\text{hour}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{hour}$. In the dog and in the cat doses are:

- < 5 kg: fold in half a 25 $\mu\text{g}/\text{hour}$ band-aid (never cut a fentanyl band-aid because the release of active principle would be altered);
- 5-10 kg: a 25 $\mu\text{g}/\text{hour}$ band-aid;
- 11-20 kg: a 50 $\mu\text{g}/\text{hour}$ band-aid;
- 21-30 kg: a 75 $\mu\text{g}/\text{hour}$ band-aid;
- > 30 kg: a 100 $\mu\text{g}/\text{hour}$ band-aid.

Collateral effects of fentanyl band-aids are: minimal sedation, light ataxia and dysphoria. They are not indicated in case of acknowledged oversensitivity to the drug, central hypoventilation, increase of intracranic pressure, hepatorenal dysfunctions and fever (the a higher body temperature may increase release level and serum concentration). Possible inconveniences are: band-aid damaging, ingestion and removal by the animal; unintentional contact with man (mainly children); insufficient release because of poor contact with the skin; too high blood concentrations following excessive sedation.

1. Epidural route. Morphine is the drug most used for this route, but recently the interest has been focused on other principles (α_2 -agonists and local anesthetics).

Advantages are:

- deep and long-lasting analgesia not associated to sensorial, sympathetic or motor block;
- analgesia without sedation or respiratory depression;
- 30-40% reduction of halogenates if used in anesthesia.

Disadvantages are:

- invasive technique that requires a thorough asepsis;
- 30-60 minutes onset;
- difficulty in overweight animals;
- sometimes inadequate analgesia level.

There might be some complications:

- itchiness after administration;
- hair colour change around injection spot;
- nausea, vomit and urinary retention;
- infections.

The technique for the administration of morphine (0.1 mg/kg brought to a volume of 0.2 ml/kg with physiological solution) for this route is the following:

- localization of lombovertebral space;
- area clipping and disinfection as in the preparation of operative site;
- repere point: just caudally to the median point of the line which ideally connects hip-bone wings (perform all actions with sterile gloves);
- insert a spine needle (small size animals 22 G. 1.5 inches long, medium size animals 20 G 1.5 inches long, large size animals 20 G 2.5-3 inches long)

- perpendicularly to the skin and push it forward;
- when the needle enters the spine ligament it is slightly “sucked in”;
- take off the drill chuck and inoculate a small quantity of physiologic solution;
- if there is no resistance, connect the needle and inoculate morphine;
- if cefalo-rachydian liquor comes out, the needle is in the subarachnoid space so it is to be unthread and the procedure has to be repeated.

Following the characteristics of some opioids are described:

Morphine (18):

- deep analgesia;
 - light to moderate sedation;
 - dose-dependent respiratory sedation;
 - minimal myocardium depression;
 - vomit and, occasionally, defecation after premedication;
 - constipation after prolonged use;
 - histamine release if administered by endovenous bolus at high doses;
 - action duration: 2-4 hours;
 - low cost;
 - CRI: 0.15 mg/kg iv bolus followed by 1-2 µg/kg/min iv (morphine 60 mg in a bag of balanced solution: administer a drop each kg p.v. of the animal).
- Oxymorphone (not commercially available) - hydromorphone (18)
- 10 times more powerful than morphine;
 - less incidence of vomit;
 - minimum histamine release after endovenous bolus administration;
 - action duration: 1-2 hours;
 - more expensive than morphine;
 - CRI: 0.05 mg/kg iv bolus followed by 0.2 µg/kg/min iv (12 mg in a bag of balanced solution: administer a drop each kg p.v. of the animal).

Meperidine (18):

- less sedation than morphine;
- less incidence of vomit and defecation;
- histamine release if administered by endovenous bolus;
- only opioid with depressant effect on myocardium;
- increase of heart frequency because of a light atropine-like effect;
- action duration: 1-2 hours.

Fentanyl (18):

- commonly used in CRI or in band-aids;
- 75-125 more powerful than morphine;
- doesn't cause histamine release;
- bradyarrhythmia;
- respiratory depression;
- short action duration: 10-45 minutes;
- CRI: 0.005 mg/kg iv bolus followed by 0.05-0.1 iv µg/kg/min.

Butorphanol (18):

- at the beginning used in veterinary medicine as anti-coughing;

- 5-10 times more powerful than morphine;
- light sedation;
- minimal respiratory depression;
- action duration: 1-3 hours;
- CRI: 0.2 mg/kg iv bolus followed by 0.2 µg/kg/min iv (12 mg in a bag of balanced solution: administer one drop each kg p.v.).

Nalbuphine (18):

- similar to butorphanol;
- action duration: 1-2 hours.

Buprenorphine (18):

- minimal cardiorespiratory depression at suggested doses (10 µg/kg);
- long action duration: 4-8 hours;
- particularly suitable for pain treatment in the cat.

Tramadol (6):

- weak opioid, synthesis similar to codeine;
- therapeutic effect 0.05 time than morphine;
- low affinity to µ receptors;
- analgesic activity by interfering on noradrenergic and serotonergic transmission and inhibiting the neuronal reuptake of noradrenalin;
- minimal respiratory and cardiocirculatory and gastrointestinal motility depression;
- may cause nausea and vomit;
- fast absorption (87%) after oral administration in the dog;
- onset: 10-20 minutes;
- blood peak after 2 hours;
- action duration: 6-8 hours;
- renal (90%) and fecal (10%) excretion;
- 5-7 hours half life in the man while in the dog the metabolism is faster;
- may be administered by os, im and ev;
- dosage for post-operative and neoplastic pain therapy: 1-4 mg/kg each 6-8 hours;
- CRI: 2 mg/kg iv bolus followed by 0.2 mg/kg/h iv;
- doesn't give addiction;
- is not included in any table.

The opioids are often used in association with a tranquilizer for the neuroleptoanalgesia that allows to enhance the opioids effects reducing dosages and collateral effects. The most used associations are:

- acepromazine 0.01-0.05 mg/kg (up to a maximum of 1 mg) im + morphine 0.1 mg/kg im;
- acepromazine 0.01-0.05 mg/kg (up to a maximum of 1 mg) im + butorphanol 0.2 mg/kg im;
- acepromazine 0.01-0.05 mg/kg (up to a maximum of 1 mg) im + buprenorphine 10 µg/kg im;
- midazolam 0,2-0.5 mg/kg im + morphine 0.1 mg/kg im;
- midazolam 0,2-0.5 mg/kg im + butorphanol 0.2 mg/kg im;

- midazolam 0,2-0.5 mg/kg im + buprenorphine 10 µg/kg im.

α_2 -agonists

Adrenergic α_2 receptors are a subclass of adrenergic receptors family. α_2 receptors may cause analgesic, sedative and anticonvulsive effects. α_2 receptors are in CNS, in gastro-enteric tract, in uterus, in kidneys and in platelets. Inside the sympathetic nervous system there are prejunctional inhibitory receptors. The analgesia determined by α_2 receptors is similar to the one caused by opioids because:

- α_2 and opioids receptors are situated in similar cerebral areas and some are on the same neurons;
- both types of receptors are connected to the same signal transducer and both types of agonists exploit the same effector mechanism: μ opioids receptors and α_2 receptors produce similar effects;
- when μ -agonists opioids and α_2 -agonists bind themselves to their specific receptors, the G proteins associated to the membranes activate themselves, triggering the same chain of events;
- the activation of G proteins determines the opening of potassium channels in the neuronal membrane with loss of potassium, and cells hyperpolarization;
- μ -agonists opioids cause the same pharmacological effects because receptors, although different, are located in similar cerebral regions and on the same neurons (23).

α_2 -agonists cause unwanted, sometimes noticeable too, effects:

- bradycardia;
- hypotension;
- sensitization of myocardium to catecholamines;
- cardiac arrhythmias: sinoatrial block, I and II degree atrioventricular block, atrioventricular dissociation, sinus arrhythmia;
- bradypnea and reduction of respiratory deepness;
- larynx relaxation inhibition of cough reflex;
- vomit (frequent in the cat);
- abdominal relaxation (in large size dogs);
- hypothermia caused by depression of thermoregulatory centre;
- hyperglycemia caused by inhibition of insulin release.

However, the effects of α_2 -agonists can be antagonized by specific antidotes (atipamezole, yohimbine, tolazoline, idaxozan).

In veterinary medicine the most commonly use α_2 -agonists are xilazine, medetomidine, romifidine e detomidine.

Administration may be oral, subcutaneous, intramuscular, endovenous and epidural.

In order to enhance the analgesic and sedative effect and reduce the collateral effects, the α_2 -agonists can be administered in association with opioids (medetomidine 5-10 µg/kg im o iv + butorphanol 0.2 mg/kg im o iv).

In managing postoperative pain in the dog the endovenous administration of medetomidine at a dose of 1-2 µg/kg proved very useful and practical.

Local anesthetics

Local analgesia is obtained by compression of a nervous trunk (sufficient for a needle inserting), by perfrigeration (ice application on the area or with etilic spray) and by administration of pharmacological substances. (29).

Local anesthetics determine analgesia interfering on the nervous fiber with the permeability of cell membrane to sodium and calcium at the level both receptors and synapses, and directly with the receptor or the neurotransmitter, in synapses. Adding alkalizers, vasoconstrictors (adrenalin and noradrenalin: vasoconstriction avoids the diffusion of analgesic extending its duration) or enzyme (hyaluronidase) to local anesthetics formulation enhances their action. There are many principles, but the most commonly used in veterinary medicine are lidocaine and bupivacaine (table 2).

Substance	Potency (procaine = 1)	Toxicity (procaine = 1)	Notes
procaine	1:1	1:1	Concentration 0.5-4%; infiltration, regional e conduction analgesia
tetracaine	12:1	10:1	Concentration 0.1-0,2%; infiltration analgesia; slow onset; topical pathway (eye)
lidocaine	2:1	1:1	Concentration 0.5-5%; infiltration and topical analgesia; excellent diffusion and quick onset
prilocaine	2:1	1:1	Shorter latency period but longer duration than lidocaine
mepivacaine	2.5:1	0.5:1	Concentration 1-2%; infiltration and regional analgesia; doesn't have a vasodilatator effect
bupivacaine	8:1	0.05:1	Concentration 0.25-0.75%; infiltration and conduction analgesia
etidocaine	3:1	0.05:1	Shorter latency period than bupivacaine

Table 2: local anaesthetics characteristics (29).

Lidocaine has a fast onset (5-10 minutes) and lasts 1-2 hours. The inoculation causes burning feeling which can be reduced mixing sodium bicarbonate. Bupivacaine has a latency period of 20 minutes, but a duration of 4-6 hours (23).

The administration of local anaesthetics can be done in different ways:

1. topical application, specific for the eyes, skin and mucous membrane analgesia. It is obtain mixing an analgesic (in solution, gel, paste or spray) straight on

the area. It doesn't cause motor block;

2. spray blocks. Local anaesthetics are sprayed and distributed in the surgical area or infused or let drip along the line cut at the time of closing or, around the fracture (23). Bupivacaine is often used in direct infusion in thoracic draining after thoracotomy in order to provide intrapleural analgesia.

3. infiltration. Can be realized in different ways:

- linear block: the analgesic is inoculated around the sensitive fibre by intradermal, subcutaneous or intramuscular pathway (e.g. : infiltration of the abdomen ventral line or lateral abdomen for the caesarean cut in the ruminants); it doesn't cause motor block;
- articular block: administration of a local anaesthetic inside an articular or tendon bursa; it is not a feasible method for surgery but it is helpful for therapy; it doesn't cause motor paralysis;
- field block. Infiltration around or inside the area to render insensitive; used for the removal of nipples, cysts, small superficial nodules; a particular technique is the intratesticular infiltration used for castration; it doesn't cause motor paralysis;
- circular field block: the tissues around an extremity are infiltrated in order to reach a terminal analgesia; it is used for surgery of the tail, the nipple or a limb distal part; it causes sensitive and motor paralysis.

4. regional (29). It is obtained when the analgesic is inoculated around the spinal cord or in an area containing a nerve plexus.

- regional inverted L analgesia: is obtained inoculating the analgesic cranially and above the line of incision for the laparotomy of the ruminants. Frequently the analgesia is not complete;
- regional epidural analgesia: consists of inoculating the analgesic in the epidural space, that is between the dura mater and the periosteum. It is classified based on the extension of the sensitive and motor block, which is related to the amount of anaesthetic administered, in high epidural analgesia (the anaesthetic reaches beyond the II sacral vertebra, sciatic eminence, causing the animal decubitus) and low epidural analgesia (when it doesn't interfere with the motor control of the pelvic limbs). Infections are the main complication of this technique.

Procedures vary according to species. In the horse it is better not to perform the high epidural analgesia because it is an animal that gets excited when loses control of the limbs while the low epidural it is performed inoculating 1ml/100 kg of lidocaine 2% between the I and the II vertebra. Site and method of inoculation in the bovine and the small ruminants are the same of the horse, but it is performed also the high epidural doubling the doses and the very high epidural (desensitization up to the thoracic vertebra) quadruplicating them. In the swine the high epidural is performed inoculating 1ml/5 kg of lidocaine 2% in the lombosacral space. In the dog the analgesic is inoculated in the lombosacral space because the sacrococcygeal one is too small and the doses are calculated based on animal size measuring the distance between the occipital crest and the tail base (table 3). In the cat the epidural analgesia works very well, but the lombosacral space is difficult to locate (0.25 ml/kg of lido-

caine 2% is inoculated).

Length (cm)	Lidocaine 2% (ml)	Length (cm)	Lidocaine 2% (ml)
up to a 30	up to a 1	60	5
35	1.5	65	5,5
40	2	70	6,5
45	3	75	7
50	3.5	80	8
55	4	beyond 90	> 10

Table 3: dose of lidocaine 2% according to the size of the dog.

- spinal or subarachnoid regional analgesia. It consists of inoculating the substance in the subarachnoidal space.
- intravenous regional analgesia. It is used for the analgesia of the toes of ruminants, swine and dogs. After the application of an elastic bandage on the area to desensitize, 5-30 ml of lidocaine are inoculated without adrenaline nor hyaluronidase in one of the veins of the limb distal ends (thoracic limb: radial, plantar metacarpal or dorsal metacarpal vein; pelvic limb: cranial branch of lateral saphena or lateral digital vein). The analgesia onset after 5-10 minutes, the bendage must not be left more than 90 minutes, but must not be removed before 20 minutes to avoid systemic toxicity. In 10% of cases may not cause analgesia.

5. conduction or troncular. It is used in large animals. By perineural administration of anaesthetic the conduction along one or more fibres is interrupted. On the head the auricolopalpebral, lachrymal (horse), supraorbital (horse), infraorbital and cornual (ruminants) nerves are blocked. In the limbs: digital palmar nerve and its anterior and posterior branches (horse), palmar nerve and its branches, metacarpal palmar nerve (horse), ulnar nerve and its branches (bovine), interosseous ligament (bovine), deep ligament (bovine) and superficial flexor tendon (bovine).

Also the analgesic effectiveness of endovenous administration of lidocaine, which seems able to act on opioids receptors μ e κ (2), has been known for a long time. Recently though, it has been demonstrated that the administration by continuous endovenous infusion of low doses of lidocaine [dog 2 mg/kg/h (22) and horse 50 μ g/kg/min (25)] reduces the concentration of necessary halogenates providing a reasonable analgesia without causing marked collateral effects.

Local anesthetics may cause local or systemic toxic effects. Local toxicity is due to lack of syringe, needle, solution sterility and to administration inside the nervous fiber (also to indirect irritation of surrounding tissues). Occasionally allergic reactions as rashes and hives have been recorded. Systemic toxicity occurs when the anesthetic reaches a high blood concentration. Causes may be accidental (intravasal administration) or due to a rapid absorption (administration of high doses, repeated administration, tissue very vascularized) or to a slow elimination (aged or debilitated

animals). Symptoms are muscle tremors, vomit, sedation, convulsions, hypotension following vasodilatation, arrhythmia up to cardiac arrest and bradycardia. As a therapy sympathicomimetics fluids and atropine are administered (29).

N-metil-D-aspartate receptors (NMDA receptors) antagonist: ketamine

It activates the limbic system and depresses the cerebral cortex producing analgesia, light respiratory depression, cardiac stimulation and amnesia although maintaining protective reflexes (3).

Special attention has been given to ketamine in relation to the so-called “wind-up” phenomenon, which is a progressive increment of the nervous response in the dorsal horn following identical and rapidly repeated stimuli. Clinically it means that a simple tactile stimulus can be converted in a painful feeling called allodinia. Besides, it is possible that each pain response might be amplified (iperalgesia) and prolonged. It has been demonstrated that the “wind-up” is mediated by NMDA receptors and thus might be reduced by ketamine while opioids and neuropathic agents are not effective. Ketamine reduces tolerance to morphine, so it is necessary to reduce the dose of morphine of 30-50% if administered at the same time of cicloesamine (18).

It may cause also dysphoria, hallucinations, excitation and rigidity. To control these undesired effects the association with a tranquilizer (phenothiazine o benzodiazepine) is recommended. Therapeutically it has been used in the rat (24), in the dog and the cat (18). The dose is 1-2 mg/kg iv bolus followed by a 1-2 µg/kg/min iv (18).

Non-steroidal antiinflammatories (NSAIDs)

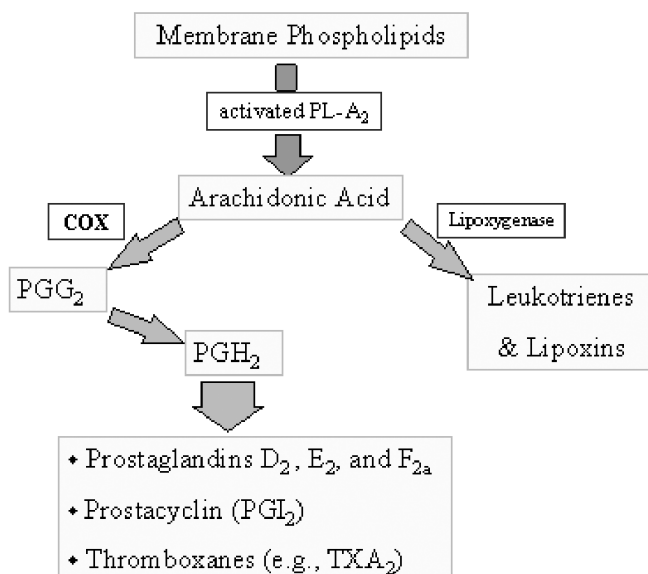


Figure 2: Enzymatic cascade responsible of flogistic processes.

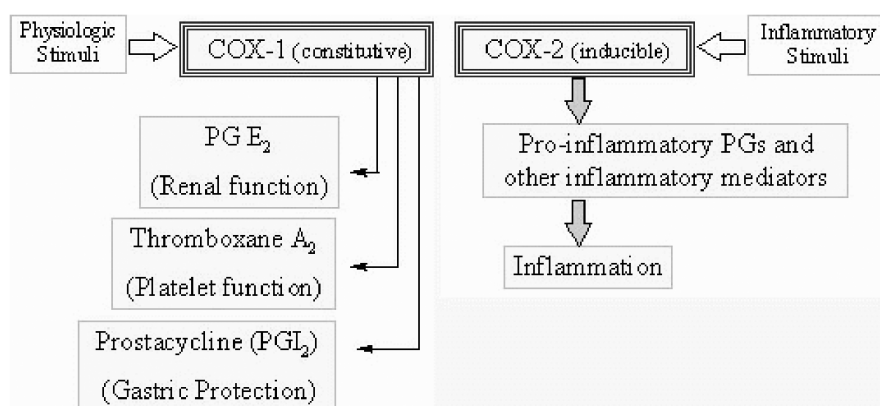


Figure 3: function of cyclooxygenases 1 e 2.

The NSAIDs suppress one or more components of enzymatic system involved in arachidonic acid metabolism and in the production of eicosanoids inhibiting prostaglandine (PG) synthesis acting on cyclooxygenase enzyme (COX) (fig 2). The synthesis inhibition is responsible for both beneficial and collateral effects. Actually there are two different COX isoenzymes: COX-1 and COX-2. The former causes the formation of PG responsible of gastric mucus quality, of bloodstream in afferent arterioles particularly in condition of hypovolemia and of processes of platelet aggregation. The administration of a NSAID that inhibits the COX-1 causes gastric irritation, the formation of ulcers, renal failure for reduced perfusion (especially in nephropathic patients) and coagulopathies (fig 3). The latter acts on PG responsables of the peripheral antiinflammatory response and of the sensitization of nociceptive fibers to antiinflammatory stimuli. COX-2 may increment also the production of PG in the bone marrow increasing and amplifying pain stimuli transmission towards higher nervous centers (5) (19). Therefore, the effectiveness and the safety of NSAIDs depend from selectivity for COX-2. NSAIDs are more appropriate for the treatment of postoperative orthopedic pain in well hydrated and normovolemic animals. They can be used also in association to other analgesic agents apart from steroidal antiinflammatory. NSAIDs must not be used in patients affected by hemorrhage, renal failure, gastric ulcer, coagulopathies and hepatopathies.

In table 4 are indicated the doses of the most used NSAIDs in veterinary medicine.

NSAIDs	dog	cat	horse	ruminants	birds
flunixin-meglumine	1.1 mg/kg iv, im, sc	0.2-0.3 mg/kg sc	0.25-1.1 mg/kg iv	1 mg/kg iv, im	0.1-10 mg/kg im
carprofen	2-4 mg/kg iv, im, sc	2-4 mg/kg iv, im, sc	--	--	1 mg/kg sc

ketoprofen	2 mg/kg iv, im, sc	2 mg/kg iv, im, sc	2.2 mg/kg iv	--	5 mg/kg im
ketorolac	0.3-0.5 mg/kg iv, im	0.2-0.3 mg/kg im	--	--	--
phenylbuta- zone	--	--	4.4 mg/kg iv, os	--	--
acetylsalicylic acid	10-40 mg/kg os	10-40 mg/kg os	15-100 mg/kg os	50-100 mg/kg os	--

Table 4: NSAIDs and their doses in various species.

The treatment with NSAIDs must be associated with gastroprotectors administration:

- ranitidine: is an H_2 receptors antagonist, protects from duodenal ulcers, reduces the volume of gastric secretions and the concentration of H^+ ;
- sucralfate: provides a protective barrier against the gastric acids tying to defects and mucosal ulcers and stimulating indirectly the production of PG; must be administered an hour before meals or other drugs because it can delay their absorption;
- omeprazole: is a protonic pump and acid gastric secretion inhibitor; is indicated for the treatment but not the prevention of ulcers.

Steroidal antiinflammatory (SAIDs)

Glicocorticoids use in analgesic therapy is still debated and controversial. SAIDs block the tissue response to chemical, thermal, anaphylactic or infective stimuli softening or blocking inflammation signs (rubor, calor, tumor and dolor) (4). The action mechanism is still unclear, but SAIDs can:

- depress the activity of fibroblasts and the formation of granulation tissue;
- prevent the liberation of lisosomal proteolytic enzymes;
- inhibit the antiinflammatory cascade reducing the activity of phospholipase;
- increase the capillary tone hence reducing the exudation and formation of oedema.

It seems that corticosteroids provide analgesia also by central action linked to the stimulation of the periaqueductal grey matter (15).

SAIDs main indications are (27): allergies and dermatitis, flogistic bowel diseases, discopathies, acute uveitis, asthma and glomerulonephritis.

Steroidal therapy, not acting on causes, is purely symptomatic and may have several collateral effects which can be more or less severe (27) as reduced tissue cicatrization, depression of immune system, increase of appetite and water intake, increase of urination, increase of protein and lipids catabolism, Cushing syndrome, diabetes Mellitus, reduction of calcium absorption and increase of renal excretion, hypotrophy of suprarenal glands and abort.

Steroidal therapy must not be stopped abruptly, but doses must be gradually reduced and the association with gastroprotectors is appropriate (see NSAIDs).

In table 5 the doses of the steroids most commonly used in veterinary medicine are reported.

steroid	dog	cat	horse	ruminants	birds
prednisone	1 mg/kg os, im	1 mg/kg os, im	0.5-1 mg/kg os	0.5-1 mg/kg os	--
prednisolone	1 mg/kg os, im	1 mg/kg os, im	0.5-1 mg/kg os	0.5-1 mg/kg os	1 mg/kg im
methilpred-nisolone	0.5-30 mg/kg iv	0.5-30 mg/kg iv	1 mg/kg im	--	0.04-0.06 mg/kg im
betamethasone	0.02-0.1 mg/kg im	0.02-0.1 mg/kg im	0.2 mg/kg im	--	0.06-2 mg/kg im
desamethasone	0.1 mg/kg iv	0.1 mg/kg iv	0.06 mg/kg im	0.06 mg/kg im	2-4 mg/kg im

Table 5: Doses of some SAIDs in various species.

Pre-emptive analgesia and balanced multimodal analgesia.

For many years pain has been treated only when it occurred that is when the nociceptive mechanism had already been triggered.

At the end of the 80s the concept of pre-emptive analgesia was introduced, that is the prevention of the conduction of the pain stimulus. It has been assumed that pain impulse, generated by a peripheral insult and directed to spinal cord, may induce a central nervous sensitization or hyper-excitability of the neurons of the dorsal horn (wind-up). This fact produces a decrease of pain threshold and the amplification of the peripheral stimulus by the sensitized neurons. As a result, interrupting the transmission of the pain stimulus, the central sensitization is avoided. Therefore, not only pain has to be treated during and after surgery, but it has to be prevented, avoiding central sensitization because once it has been generated it cannot be cancelled.

The analgesic and anaesthetic management for surgery must take account of a pre-surgery administration of analgesics which must be continued post-surgery. Besides it is appropriate to perform a balanced and multimodal analgesia, which is the administration of two or more classes of analgesics able to interfere with nociception at different levels, because the analgesia is enhanced (6).

Acupuncture

According to traditional Chinese medicine, living organism are a road atlas of energy conducts, called meridians or channels which transport vital energy inside and outside the body. Any interference or interruption of energetic flow damages the

normal function of the organism causing a disease. Acupuncture can also be used diagnostically in order to point out an energetic block of the meridians (28).

The success of acupuncture depends from the correct selection of (13):

- needle insertion point;
- needle size (in relation to the animal size and to the region to treat: 0.5 inch needles for areas just above bones as the head or the snout; 1.5-2.0 inch needles for deep penetration; 1.0 inch needles for most treatments);
- depth of penetration;
- duration of treatment (the application may vary from 10 seconds to 30 minutes 1 or twice a week for 2-6 months in relation to the disease; improvement usually follows the third treatment).

In the dog satisfactory results have been obtained using acupuncture in the treatment of (28): arthritis, otitis, cardiovascular diseases, immune mediate disease, discopathies, chronic respiratory diseases, dermatologic, gastroenteric and gynaecologic problems. Acupuncture is not indicated for the treatment of anxious dogs or dogs undergoing steroidal therapy or with tumours.

In the horse, acupuncture has been used successfully, alone or in association with traditional medicine, for (13): peripheral nerves paralysis, laminitis, lameness of muscle skeletal origin, hives, shock, gastric ulcers and neurological problems.

There are different acupuncture techniques used for horses (13): traditional acupuncture, electroacupuncture, moxibustion and laser stimulation.

Acupuncture is considered a philosophy more than a medical therapy, but an attempt has been done to understand how it can cause analgesia. There are no certainties, only hypothesis (28):

- “gate” theory, as with ketamine;
- humoral theory (stimulation of endogenous opioids production);
- autonomic theory: internal organs can be stimulated by acupuncture of external points that selectively activate sympathetic and parasympathetic nervous systems;
- anatomic theory: acupuncture determine local vasodilatation favouring the removal of flogistic substances;
- bioelectric theory: meridians are electric lines and acupuncture points act as amplifiers.

Acknowledgement

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

References

1. ACVA position paper on pain treatment. <http://www.acva.org/professional/Position/pain.html>
2. Baranowsji A.P., De Courcej J., Bonello E. (1999) A trial of intravenous lidocaine on the pain and allodynia of postherpetic neuralgia. *J Pain Symp Manag*, 17: 429-433.

3. Binns A. Ketamine in palliative care. <http://www.medicineau.net-au/clinical/palliative/ketamine.html>
4. Booth N.H., McDonald L.E. (1991) Farmacologia e terapeutica veterinaria. Edizioni Mediche Scientifiche Internazionali, Roma, Italia.
5. Borer L.R., Peel J.E., Sewald W., Schawalter P., Spreng D.E. (2003) Effect of carprofen, etodolac, meloxicam or butorphanol in dogs with induced acute synovitis. *Am J Vet Med*, 64: 1429-1437.
6. Breggi G., Bianchi E., Leonardi L. (2003) Impiego del tramadolo in analgesia preventiva. Atti III Giornata di aggiornamento in Anestesiologia Veterinaria, Messina: 32-38.
7. Colantonio D. Evaluation of postoperative pain in dogs. http://vein.library.usyd.edu.au/links/Essays/2000_colantonio.html
8. Dunn T.J. Managing pain in dogs. <http://www.thepetcenter.com/gen/pm.html>
9. Firth A.M., Haldane S.L. (1999) Develop of a scale to evaluate postoperative pain in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 214: 651-659.
10. Fonda D. (1998) Le vie del dolore. Atti dell'Incontro Scientifico "Terapia del dolore acuto e cronico negli animali da compagnia", Milano: 3-8.
11. Fonda D. (2004) Meccanismi del dolore negli animali: interocezione, omeostasi e controllo emotivo. Atti IV Giornata di aggiornamento in Anestesiologia Veterinaria, Messina: 1-8
12. French E., Van de Woude S., Granoeski J., Maul D. (2000) Assessment of pain in laboratory animals. National AALAS Meeting, San Diego, Contemporary Topics, 39: 85.
13. Hayes K.E.N. Acupuncture - Is it for your horse? <http://equisearch.com/care/alternative/eppins721/>
14. Holton L.L., Scott E.M., Nolan A.M., Reid J.W., Flaherty D. (1998) Comparison of three methods used for assessment of pain in dog. *J Am Vet Med Assoc*, 212: 795-796.
15. Iarushkina N.I., Bogdanov A.I., Filaretov A.A. (1991) The central gray substance of the midbrain: the role of corticosteroid in the analgesic effect. *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova*, 4: 83-89.
16. Johnson J.M. (1991) The Veterinarians responsibility: assessing acute pain in dogs and cats Part 1. *Compend Contin Educ Pract Vet*, 13: 804-807.
17. Joyce C.R.B. (1975) Comparison of fixed interval and visual analogue scales for rating chronic pain. *Eur J Clin Pharmacol*, 283: 151-164.
18. Ko J. Perioperative pain and distress. <http://www.cvm.okstate.edu/Course/vmed5412/pdf/21-22PainManagemente.pdf>
19. Lascelles D. (1999) Trattamento del dolore acuto e cronico. Atti del 38° Congresso Nazionale SCIVAC, Montecatini: 1-12.
20. Lumb W.V., Jones E.W. (1996) Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia-3rd edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, US.
21. Mathews K.A. (2000) Pain assessment and general approach to management. *Vet Clin North Am: small an prac*, 30: 729-755.
22. Melanie P., Briganti A., Leonardi L., Breggi G. (2004) Infusione endovenosa

- continua di lidocaina nel cane: valutazione della sua efficacia e sicurezza in anestesia generale. Atti XI Congresso Nazionale SICV, Torino: 42-45.
23. Paddleford R.R. (2000) Analgesia e controllo del dolore. In: Anestesia dei piccoli animali. Masson Edizioni Veterinarie, Cremona: 237-257.
 24. Richebe P., Rivat C., Laulin J.P., Marette P., Simonett G. (2005) Ketamine improves the management of exaggerated postoperative pain observed in perioperative fentanyl-treated rats. *Anesthes*, 102: 421-428.
 25. Ringer S., Kalchofner K., Boller J., Furst A., Bettschart-Wolfensberger R. (2005) Comparison of lidocaine versus medetomidine constant rate infusion during isoflurane anaesthesia in horses. *Proceedings of AVA Spring Meeting*, Rimini: 77.
 26. Taylor R. (2000) Lecture notes in physiology. V3008 Department of Physiology, University of Sidney.
 27. The veterinary use of glucocorticosteroids in pets. <http://www.peteducation.com/article.cfm?cls=0&cat=1466&articleid=1422>
 28. Thorpe-Vargas S., Gargill J.C. Acupuncture for dogs gaining acceptance. http://www.acupuncture.com/newsletters/m_mar03/main2.htm
 29. Zanichelli S., Scrollavezza P. (1996) Manuale di anestesiologia veterinaria. Parte 1^a. Edizioni Scientifiche Oppici, Parma.

THE AUTONOMIC AND SENSITIVE INNERVATION OF THE OSTRICH COPULATORY ORGAN

L'INNERVAZIONE AUTONOMA E SENSITIVA DELL'ORGANO COPULATORE DELLO STRUZZO.

Luisa Bo Minelli*, Maddalena Botti*, Angelo Antonio Dessole**,
Giovanni Palmieri**, Franca Acone**

PAROLE CHIAVE:

struzzo, organo copulatore, innervazione autonoma e sensitiva.

KEY WORDS:

ostrich, copulatory organ, autonomic and sensitive innervation.

Riassunto

È stata studiata l'innervazione dell'organo copulatore dello struzzo che è costituita da due componenti: autonoma e sensitiva.

La prima consta di cellule gangliari, isolate e riunite in gruppi, localizzate lungo il decorso di fasci nervosi o nel punto di convergenza di due o più di questi.

La seconda è formata da terminazioni libere e da terminazioni fornite di capsula. Queste ultime mostrano struttura tipica, sono morfologicamente classificabili come corpuscoli di Pacini, paciniformi e corpuscoli genitali e possono trovarsi isolate, riunite a formare infiorescenze ed organizzate in corpuscoli opposto-polari e fibre nervose pecilomorfe.

I corpuscoli di Pacini sono numericamente prevalenti, mentre i paciniformi sono i meno rappresentati.

Summary

The autonomic and sensitive innervation of the ostrich copulatory organ was studied.

The former consisted by isolated and grouped ganglion cells, located along the course of nerve bundles or in the convergence point of two or more of these fascicles.

The latter is represented by free and encapsulated nerve terminations. These last one, morphologically classified as Pacini, Pacini-like and genital corpuscles,

*Dept. of Animal Health, University of Parma, Parma, Italy.
Via del Taglio, 8 - 43100 Parma - Tel. 0521/032637 - Fax 0521/032642
e-mail: luisa.bo@unipr.it

**Dept. of Animal Biology, University of Sassari, Sassari, Italy.

showed the typical structure and could be found isolated or assembled to organize flower-sprays, opposite-polar corpuscles or poikilomorphous nerve fibres.

The Pacini corpuscles were numerically prevalent, while the Pacini-like terminations represented the less numerous receptorial type.

Introduction

The copulatory organ of the birds has generally a little development and generally it is not visible because it is located in the ventral part of proctodeum, near to the mucous plica that delimited the cloacal hole.

The observations about the birds proctodeum are not very numerous (1-7) and they concern the female of limited species (duck, turkey, chicken, quail, crow, pigeon, buzzard, goose, ostrich). There are analogous informations about the copulatory organ (1; 4-5; 7).

The aim of the present research was to study, quantitatively, qualitatively and topographically, the nervous autonomic and sensitive somatic components, located in the ostrich copulatory organ.

Materials and methods

The copulatory organ of 3 male, 18 months old, ostriches was taken soon after the slaughtering. These samples were opportunely selected on the basis of their topography with refer to the total organ and on the basis of their depth with refer to the thickness of the wall.

From one subject the samples were processed with the gold chloride method according Ruffini (8).

From another subject, the samples were submitted to aforesaid method but modified by Goglia (9).

From the last subject, the samples were processed with the aforesaid method but modified by Pelagalli and Schiavo (2) and Pelagalli and Cecio (3).

Results

In the studied copulatory organs we constantly found different free and encapsulated sensitive nervous terminations and an autonomic nervous component.

These sensitive and autonomic nervous components were uniformly distributed in the organs of the 3 subjects, but they were differently located in the thickness of the organs. In fact the major concentration was found in the connective tissue of the lamina propria and submucosa. In the muscular coat the nerve trunks, with different diameter, were found near the blood vessels (fig. 1).

The autonomic innervation was much more present in the districts where the vascular component was major concentrated. This autonomic ones was represented by ganglion cells. They had ellipsoidal shape and they were located along the nervous bundles, near their epineural coating or in their perineural connective tissue. The ganglion cells were observed isolated or grouped. They had the minor diameter rang-

ing between 3,6 and 6,7 μm and the major ones ranging between 7,1 and 12,3 μm . The finding of little grouping (5-40 cells), located in the convergence point of two or more nervous bundles, was more frequent than the finding of isolated cells and of grouping more numerous (fig. 2).

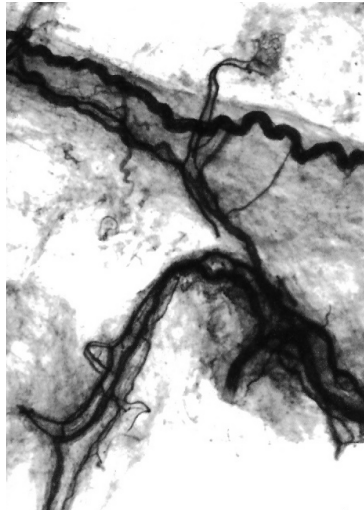


Figure 1:
Ostrich: copulatory organ. Nerve trunks and blood vessels run together. Gold chloride method according to Ruffini. 120x.



Figure 2:
Ostrich: copulatory organ. The arrow indicates a cluster of ganglion cells in the point of convergence of 3 nerve fascicles. Gold chloride method according to Ruffini modified by Goglia. 80x.

The sensitive innervation was represented by the above mentioned free nerve endings and by encapsulated receptors, that were morphologically classified as Pacini (fig. 3, A, B), Pacini-like and genital corpuscles (fig. 4).

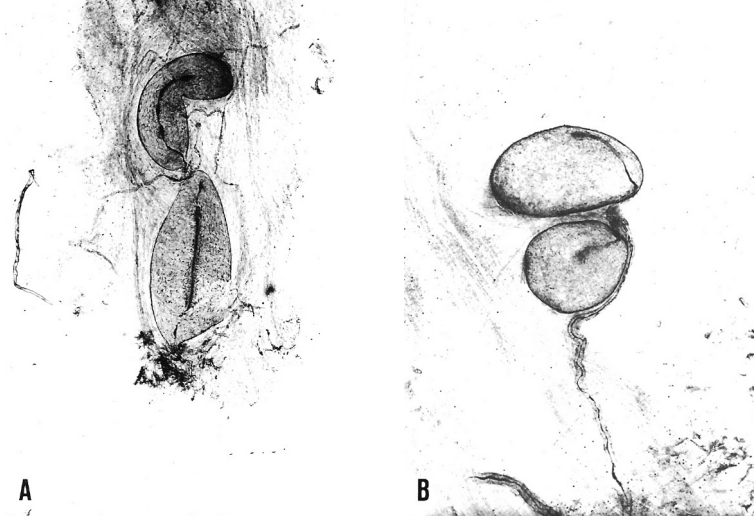


Figure 3 A, B:
Ostrich: copulatory organ. The Pacini corpuscles show different morphology. Gold chloride method according to Ruffini modified by Goglia. 120x.

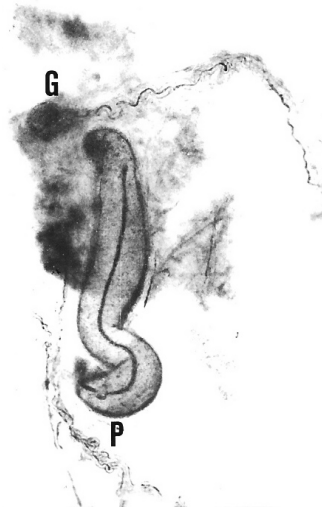


Figure 4:
Ostrich: copulatory organ. Pacini-like (P) and genital (G) corpuscles. In particular the typical structure of Pacinian-like is emphasized. Gold chloride method according to Ruffini modified by Pelagalli, Schiavo and Pelagalli, Cecio. 120x.

The free nerve endings originated from the thinner fibres that travelled isolated drawing fine volutes or complicated nets.

The encapsulated receptors were differently sustained by thicker fibres that were distributed in the thickness of the lamina propria and in the submucosa.

The structure of encapsulated corpuscles was typical. In particular, the Pacini and Pacini-like corpuscles were supplied with an expansional axon that was undivided or branched and that had a rectilinear or curved course. This axon was located in the support sole and only rarely it terminated with the typical apical button. In the genital corpuscles, the manner of the expansional axon was different on the basis of the corpuscles shape. In fact, when the genital corpuscle was ellipsoidal, the axon branched off repeatedly and the originated thin branches terminated in a small varicosities. Differently, when the genital corpuscle was spheroidal, the axon terminated undivided to organize a clew with bend more or less dense or it divided and the branches interlaced repeatedly (fig. 5, A, B). The capsule, that had a lamellar organization (fig. 6 B), showed a different thickness. As a rule, the major thickness was observed in the Pacini corpuscles while the minor ones in the genital corpuscles.

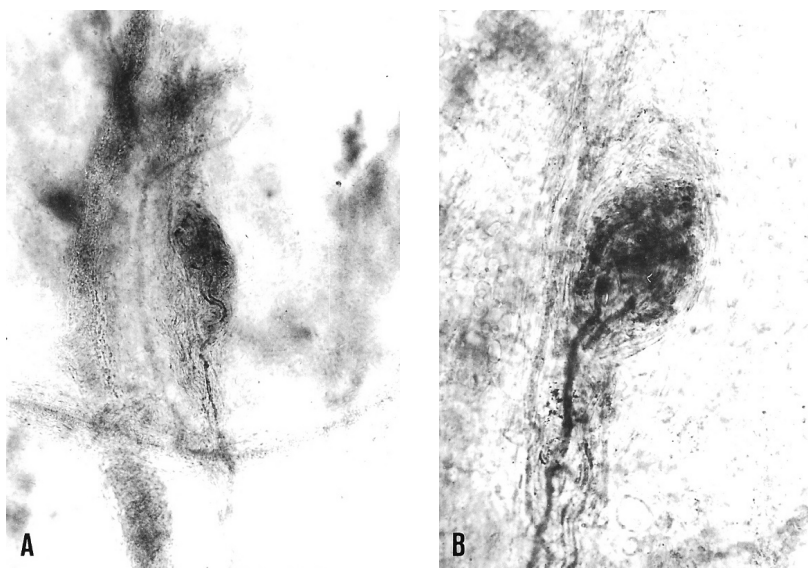


Figure 5 A, B:

Ostrich: copulatory organ. 2 genital corpuscles: ellipsoidal (A), spheroidal (B). Gold chloride method according to Ruffini modified by Goglia. 120x (A); 300x (B).

The more numerous corpuscles were Pacinian, while the less numerous were the Pacinian-like. The different corpuscles could be isolated or grouped into simple (fig. 6, A, B) or complex (fig. 7) flower-sprays, opposite-polar corpuscles (corpuscles were located one after another along the course of nervous fibre that was defined ultraexpansional, fig. 8) and poikilomorphous fibres (a fibre dichotomically divided into two branches that ended in two morphologically different corpuscles, fig. 9).

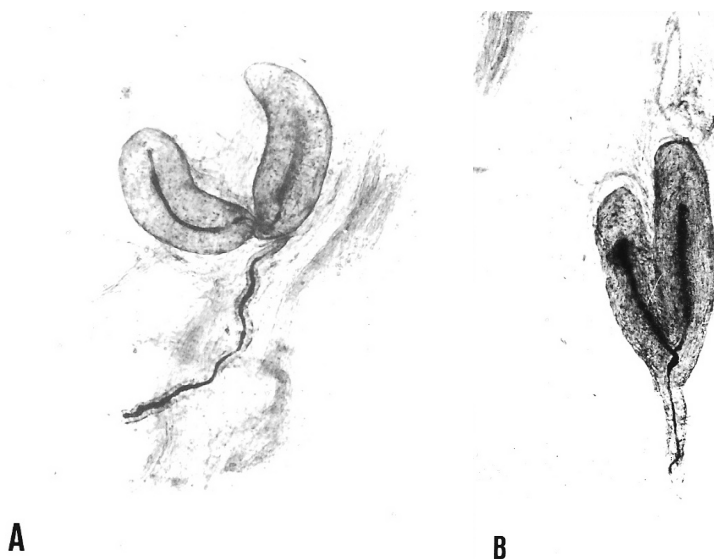


Figure 6 A, B:

Ostrich: copulatory organ. Simple flower-sprays of Pacini corpuscles. It is possible to see the lamellar structure of the capsules (B). Gold chloride method according to Ruffini modified by Pelagalli, Schiavo and Pelagalli, Cecio. 120x.

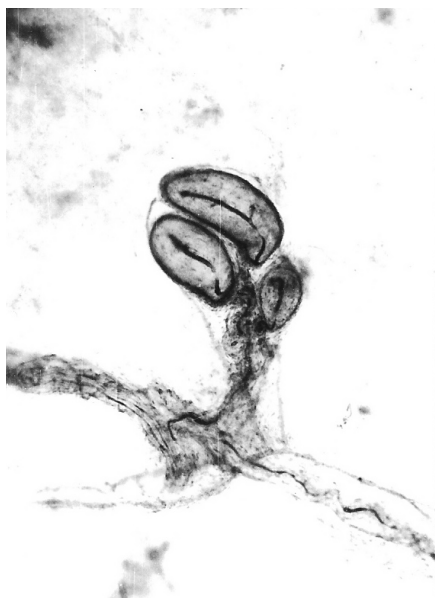


Figure 7:

Ostrich: copulatory organ. Complex flower-sprays of Pacini corpuscles. Gold chloride method according to Ruffini modified by Pelagalli and Schiavo, Pelagalli and Cecio. 80x.



Figure 8:

Ostrich: copulatory organ. Opposite-polar corpuscles. The arrows indicate the boundary marker between 2 Pacini-like and Pacini corpuscles located along the same nervous fibre. Gold chloride method according to Ruffini modified by Pelagalli and Schiavo, Pelagalli and Cecio. 80x.

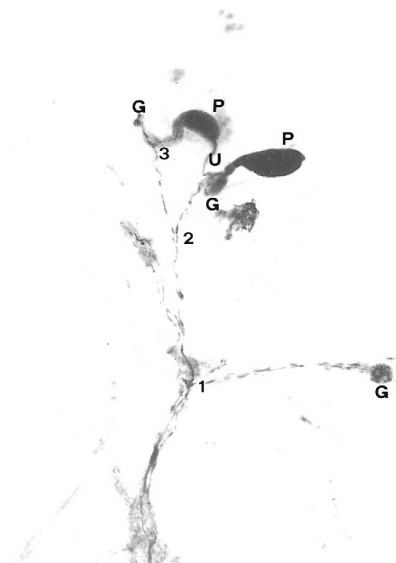


Figure 9:

Ostrich: copulatory organ. The picture shows the co-existence of opposite-polar and poikilomorphous fibres: G, genital corpuscles; P: Pacini corpuscles; U: ultraexpansional fibre. See text for explanation. Gold chloride method according to Ruffini modified by Pelagalli and Schiavo, Pelagalli and Cecio. 65x.

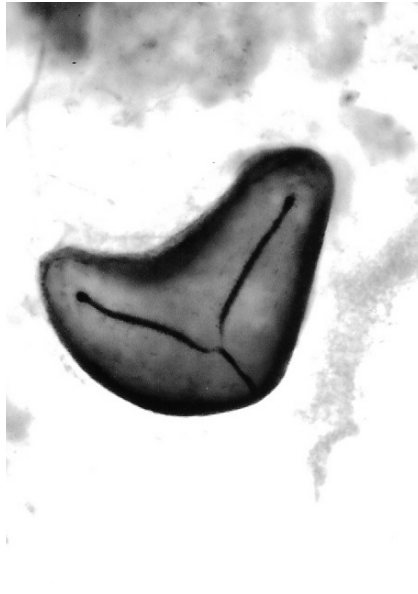


Figure 10:

Ostrich: copulatory organ. Corpuscle with strange shape. Gold chloride method according to Ruffini. 120x.

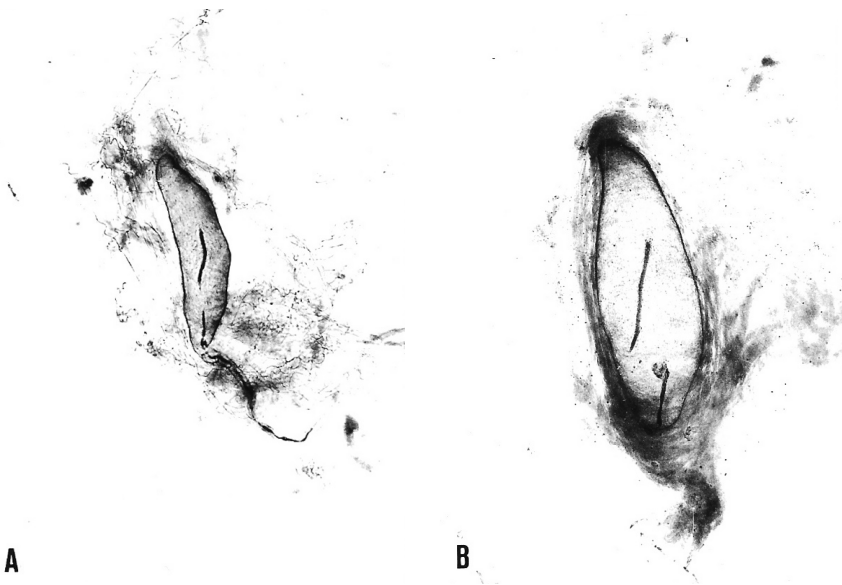


Figure 11 A, B:

Ostrich: copulatory organ. Fragmentation of expansional axon of 2 Pacini corpuscles. Gold chloride method according to Ruffini modified by Pelagalli and Schiavo, Pelagalli and Cecio. 80x (A), 120x (B).

In particular, this last finding documented, for the first time, the existence of a opposite-polar and, contemporaneously, poikilomorphous fibre. This fibre branched off and gave origin to two branches (fig. 9/1). One of these branches, down on the right, gave origin to a genital corpuscle (fig. 9/G), while the other branch, on the left, branched off and the originate branches had a different manner (fig. 9/2). In fact, one branch on high and the right sustained two opposite-polar corpuscles morphologically different: a genital (fig. 9/G) and a Pacinian (fig. 9/P). The other branch, on high and on the left, dicotomically branched off (fig. 9/3) and the originated branches terminated in a little genital corpuscle (fig. 9/G) and in a Pacinian (fig. 9/P). The expansional axon of the Pacinian come out from the opposite pole of the receptor as on ultraexpansional fibre (fig. 9/U) that substained the innervation of the aforesaid genital corpuscle (fig. 9/G).

Finally we observed corpuscles with strange shape (bi-lobate corpuscle, fig. 10) and with fragmentation of expansional axon (fig. 11, A, B). These findings are probably due to deviations of organogenetic processes by exogen or endogen factors.

Discussion

An autonomic and sensitive innervation was always present in the ostrich copulatory organ. These findings were in according with that found in the ostrich by Palmieri et al. (7) and in other species by Pelagalli and Schiavo (2), Pelagalli and Cecio (3), Pelagalli et al. (4). Differently Stefanelli (1) and Esposito et al. (5) have not examined the autonomic nervous component.

However our data on autonomic innervation confirmed the results of our previous observations carried out on the proctodeum of different birds species including the ostrich. This innervation is represented "... of ganglion cells isolated or grouped to form clusters of different sizes [...] These cells, located along the length of nerve bundless and in convergence points of two or more fascicles, are mainly distributed in the superficial layers of the proctodeum wall, close to blood vessels" (6). Also the organization and the distribution of sensitive component were in accordance with that reported by other researchers (1; 4-5; 7) who have found free and encapsulated endings. In particular, the encapsulated endings are classified as Pacini, Pacini-like and genital corpuscles. The aforesaid Authors have constantly found Pacinian and Pacinian-like; besides, we found that the Pacini corpuscles were the most numerous ones and Pacinian-like the less present.

The presence of Pacini corpuscles, with ovoidal shape, confirms the observations carried out on the proctodeum of duck, turkey, goose and ostrich (1; 3-4; 6) but this finding is not characteristic of the duck proctodeum, as instead have sustained Pelagalli and Cecio (3) and Pelagalli et al. (4).

The presence of genital corpuscles has been already documented in the proctodeum of hen, turkey and duck (2-3; 5) and in the copulatory organ of turkey and duck (4-5). Differently these corpuscles are not documented in the proctodeum of some bird species among which ostrich (6), while they are documented in the ostrich copulatory organ. About this apparently contradictory result, Palmieri et al. (6) have hypothesized that "... these corpuscles are exclusively clustered in the copulatory organ of the male and in the correspondent territory of female proctodeum" and the

results of present research confirm this hypothesis.

Therefore, we think that further researches will be necessary. In fact the different corpuscles are found in this district (Pacini, Pacini-like, genital, Ruffini, Herbst and Meissner corpuscles) but only Pacinian and Pacinian-like were constantly found. In particular the presence of the Herbst corpuscles, found in the female ostrich proctodeum (6), do not confirmed in the ostrich copulatory organ (7). Therefore the inconstant finding of the different corpuscles can also involved the genital corpuscles.

Finally further researches will be carried out to explain the presence of organogenetic alterations, as an unusual shape of corpuscles or a fragmentation of expansional axon documented in this and other (7; 10-13) studies.

References

1. Stefanelli A. (1935). Le espansioni nervose sensitive nell'organo copulatore di anitra domestica e nel proctodeum di tacchino. *Monit. Zool. Ital.* 46, 1-7.
2. Pelagalli G. V., Schiavo A. (1958). L'innervazione sensitiva del proctodeo della gallina domestica. *Acta Med. Veter.* 4, 221-239.
3. Pelagalli G. V., Cecio A. (1959). Ricerche sulla innervazione vegetativa e sensitiva del proctodeo nella femmina del tacchino. *Quad. Anat. Prat.* 15, 1-27.
4. Pelagalli G. V., Cecio A., Lembo C. (1968). Sulla innervazione sensitiva dell'organo copulatore di Meleagris gallopavo. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.* 44, 1528-1529.
5. Esposito V., Crasto A., Germano G., Varvella F. (1994). Sulle terminazioni nervose dell'organo copulatore e del proctodeo di anatra (*Anas platyrhynchos*). *Acta Med. Veter.* 40, 205-213.
6. Palmieri G., Sanna M., Bo Minelli L., Botti M., Corriero A., Desantis S., Cappai M. G., Acone F. (2003). Further observations on the sensitive innervation of some bird's proctodeum. *Ital. J. Anat. Embryol.* 108, 241-254.
7. Palmieri G., Cappai M. G., Costa G., Bo Minelli L., Botti M., Desantis S., Corriero A., Acone F. (2006). Sensitive innervation of the copulatory organ in *Struthio camelus*: comparison to the corresponding district in female proctodeum. *Ital. J. Anat. Embryol.* 111, 31-44.
8. Ruffini A. (1897). Observations on sensory nerve endings in voluntary muscles. *Brain* 20, 368-374.
9. Goglia G. (1965). Sopra una modificazione del metodo aurico di Ruffini per la dimostrazione dei recettori. *Quad. Anat. Prat.* 18, 40-56.
10. Palmieri G., Panu R., Asole A. (1979). Innervazione sensitiva del legamento sesamoideo prossimale dell'ovino. *Quad. Anat. Prat.* 35, 229-240.
11. Panu R., Asole A. (1980). Innervazione sensitiva dei cuscinetti digitali, palmari e plantari, del ratto e della cavia. *Arch. Ital. Anat. Embriol.* 85, 363-366.
12. Palmieri G., Asole A., Panu R., Farina V., Sanna L. (1982). Further observations on the innervation of the proximal sesamoidean ligament of the horse and ox. *Arch. Anat. Histol. Embryol. norm. et exp.* 65, 121-133.

- 13 Palmieri G., Acone F., Sanna M., Bo Minelli L., Botti M., Maxia M., Corriero A., De Metrio G. (2002). On the sensitive and vegetative innervation of the ostrich's palate. *Ital. J. Anat. Embryol.* 107 (suppl. 2), 5-18.

ON THE AUTONOMIC AND SENSITIVE NERVOUS COMPONENTS OF DIGITAL, METACARPAL AND METATARSAL PADS OF THE COYPU (MYOCASTOR COYPUS)

SULLA COMPONENTE NERVOSA AUTONOMA E SENSITIVA DEI TORI DIGITALI, METACARPALI E METATARSALI NELLA NUTRIA (MYOCASTOR COYPUS)

Ferdinando Gazza*, Maddalena Botti*, Luisa Ragionieri*, Angelo Antonio Dessole**,
Rino Panu*, Giovanni Palmieri**, Franca Acone**

PAROLE CHIAVE:

nutria, tori, innervazione autonoma e sensitiva.

KEY WORDS:

coypu, foot pads, autonomic and sensitive innervation.

Riassunto

L'innervazione dei tori digitali, metacarpali e metatarsali della nutria è formata da una componente autonoma e da una sensitiva.

La prima è costituita da cellule gangliari, isolate o raggruppate, situate lungo il decorso di fasci nervosi, mentre la seconda è formata da terminazioni libere e capsulate classificabili, dal punto di vista morfologico, come corpuscoli di Pacini, paciniformi e Golgi-Mazzoni.

I menzionati corpuscoli mostrano struttura tipica e si possono rinvenire isolati, riuniti a costituire infiorescenze semplici e complesse, corpuscoli opposto-polari e fibre pecilomorfe.

Gli AA. rilevano la variabilità morfologica delle forme recettoriali, rinvenute in questa ed in analoghe precedenti ricerche, ma puntualizzano che sono tutte, funzionalmente, meccanocettori e quindi compatibili con l'impegno richiesto al distretto anatomico in esame.

Summary

The innervation of the coypu foot pads (digital, metacarpal and metatarsal) is represented by an autonomic and a sensitive components.

*Dept. of Animal Health, University of Parma, Parma, Italy.
Via del Taglio, 8 - 43100 Parma - Tel. 0521/032647 - Fax 0521/032642
e-mail: ferdinando.gazza@unipr.it

**Dept. of Animal Biology, University of Sassari, Sassari, Italy.

The former is constituted by isolated or grouped ganglion cells located along the course of nerve bundles, while the latter is composed by free and encapsulated nerve endings morphologically classified as Pacini, Pacini-like and Golgi-Mazzoni corpuscles.

The above named corpuscles show the typical structure and can be found isolated or grouped to organize simple and complex flower-sprays, opposite-polar corpuscles and poikilomorphous fibres.

The AA. notice the morphological variability of the encapsulated receptors found in this and previous similar investigations but point out also that they are functionally mechanoreceptors and so compatible with the role of the considered anatomical district.

Introduction

In the support surface of the limbs of different animal species there are particular formations (footpads, tori) that have the role to absorb the pressure that unload on the ground.

Independently by their topography along the digital axis (digital pads) or distally to the metacarpo-metatarso-phalangeal joints (metacarpal and metatarsal pads), these formations are always covered by skin characterized by thick corneous coat that protects a remarkable fibro-elastic component. This last component is often characterized by remarkable adipose tissue that has a mechanical and not deposit function. In the thickness of the fibro-elastic component the vascular and nervous nets are often present.

Probably the nervous net has the role to collect the information about the ground characteristics (sandy, stony, uneven, etc) to adjust the limb position and the walk.

The importance of these structures in some animal species, in particular from a mechanical point of view, explains why the innervation of the pads are often studied (1-24).

The aim of the present research was to study the autonomic and sensitive innervation of the digital, metacarpal and metatarsal pads in the coypu (*Myocastor coypus*, fig. 1) that has never been studied.



Figure 1:
Coypu (*Myocastor coypus*).

Materials and methods

The study was carried out on samples taken from 3, 18-24 months old, coypus, that were sacrificed with an euthanasic medicine (Tanax[®], Hoechst).

From each subject, immediately after the death, the digital, metacarpal and metatarsal pads were taken. The samples of same limb and of thoracic and pelvic limb were keep distinct (fig. 2). Moreover in the samples made in the metacarpal and metatarsal pads, the peripheral area was keep distinct from the central area.

The material taken from one subject was processed with the original gold chloride technique according to Ruffini (25). The other samples were processed with the aforesaid method modified by Goglia (26).



Figure 2:

Coypu: topography of foodpads in the thoracic limb (TL) and pelvic limb (PL) of the coypu (*Myocastor coypus*).

Results

The observations have documented a conspicuous nervous component represented by trunks with different diameter, distributed near the blood vessels (fig. 3). The finding was more conspicuous in metacarpal and metatarsal pads in respect to the digital ones. Always we did not found significant differences between the thoracic and pelvic limb.

We also observed an autonomic innervation represented by ganglion cells with spherical or ellipsoidal shape (diameter ranging between 7,3 and 23,7 μm). These cells were isolated or clustered to constitute little ganglia (9-84 cells) without the capsule. The autonomic cells were located along the nervous trunks. Rarely they were found in the epineurium and in the convergence point of 2 or more trunks (fig. 4).

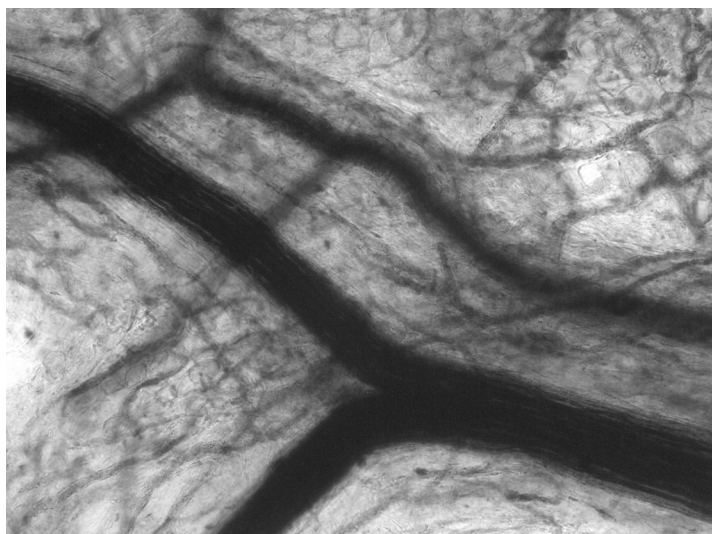


Figure 3:
Coypu: metacarpal pad. The nervous trunk run near the blood vessel. Gold chloride method according to Ruffini. 120x.

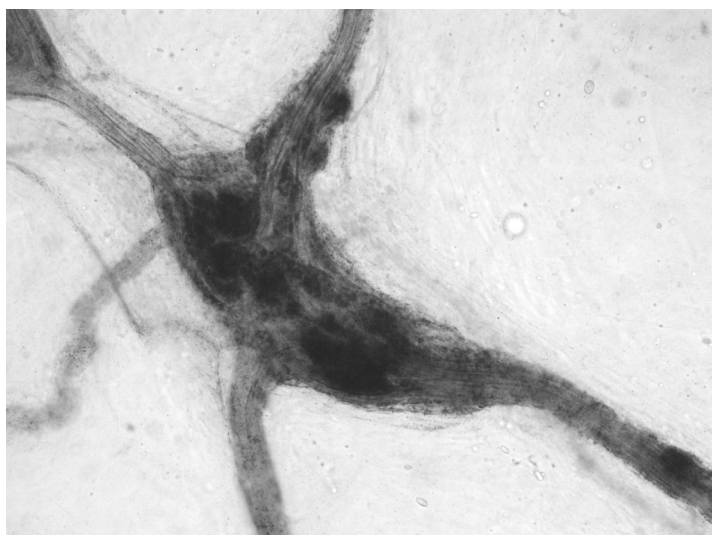


Figure 4:
Coypu: metatarsal pad. A little ganglion located in the confluence point of more nervous trunks. Gold chloride method according to Ruffini. 120x.

Isolated fibres departed from the nervous trunks. These fibres had different diameter and terminated in different ways. In fact the most thin fibres drew fine vo-

lutes with different amplexness (fig. 5) and interlacing gave origin to complicated nets. Differently, the most thick fibres finished in corpuscles that were morphologically referable to Pacini (fig. 6, A-C), Pacini-like (fig. 7), and Golgi-Mazzoni (fig. 8, A, B). The Pacini represented the most numerous corpuscles, while the Golgi-Mazzoni the most scarce.

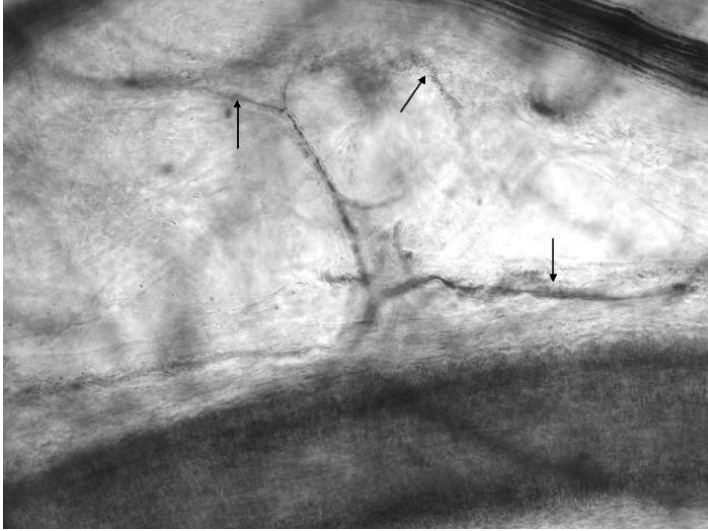


Figure 5:

Coypu: metatarsal pad. The picture shows the close relationship between blood vessels and nervous trunks. The arrows indicate thin nervous fibres terminate in free nerve endings. Gold chloride method according to Ruffini modified by Goglia. 120x.

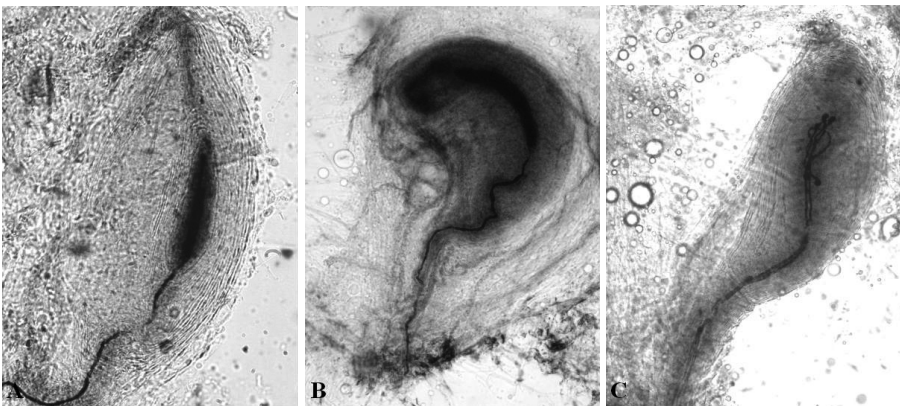


Figure 6 A-C:

Coypu: metacarpal (A), metatarsal (B, C) pads. The pictures show Pacini corpuscles with different morphology and aspect. The lamellar organization of the capsule and the manner of the expansional axon are fairly clear. Gold chloride method according to Ruffini. 250x (A), 120x (B,C).

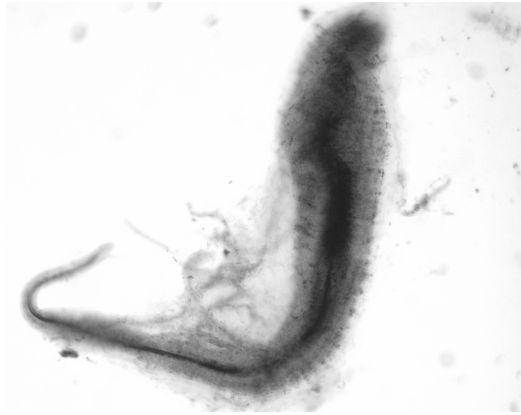


Figure 7: Coypu: metacarpal pad. Isolated Pacini-like corpuscle. Gold chloride method according to Ruffini modified by Goglia. 120x.

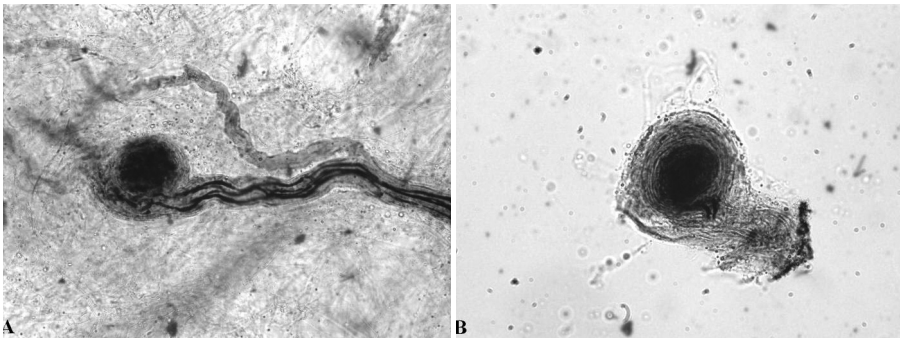


Figure 8 A, B: Coypu: metatarsal pad. Isolated Golgi-Mazzoni corpuscles. Gold chloride method according to Ruffini modified by Goglia. 250x.

Therefore, in the studied area we found not only the autonomic nervous component but also a sensitive contingent, represented by free and encapsulated endings. The obtained data documented that the nervous component, in particular the sensitive ones, was more represented into the metatarsal pads than the metacarpal ones and in these last more than digital pads of the same limb. Moreover, the sensitive component was generally located in the more superficial layer in respect to the autonomic ones.

The different corpuscles, in particular the Pacinian, were isolated or grouped (4-5 corpuscles) into simple (fig. 9, A, B) and complex (fig. 10) flower-sprays or they were located one after another along the same nervous fibre to constitute opposite-polar corpuscles (fig. 11, A, B).

The corpuscles had typical structure, even if the Pacinian with ellipsoidal shape could have rectilinear aspect or be curved. The capsule had remarkable thickness and showed a lamellar arrangement. The expansional axon was thick, undivided or branched, it showed the same behaviour of capsule and only rarely finished with

the typical end button. When the axon branched, the branches terminated with a little button (fig. 6, C).

We also observed the Pacini-like corpuscles even if they were less numerous. These corpuscles were characterized with a greater length, thinner capsule and thinner expansional axon in respect to Pacini.

The Golgi-Mazzoni corpuscles had a thick capsule that showed the lamellar arrangement. They had spherical and ellipsoidal shape and the connective of the inner core marked the course of the expansional axon (fig. 8, A, B).

A last finding was represented by poikilomorphous fibres. They dichotomically divided into 2 branches that ended in morphologically different corpuscles (fig. 12).

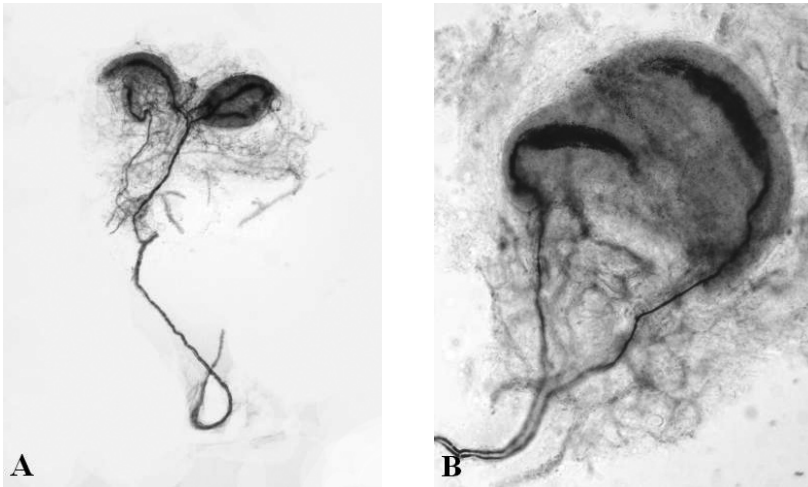


Figure 9 A, B: Coypu: metacarpal (A) and metatarsal (B) pads. Simple flowers-spray of Pacini corpuscles. Gold chloride method according to Ruffini. 40x (A); 120x (B).



Figure 10: Coypu: metacarpal pad. Complex flowers-spray of Pacini corpuscles. Gold chloride method according to Ruffini. 40x.

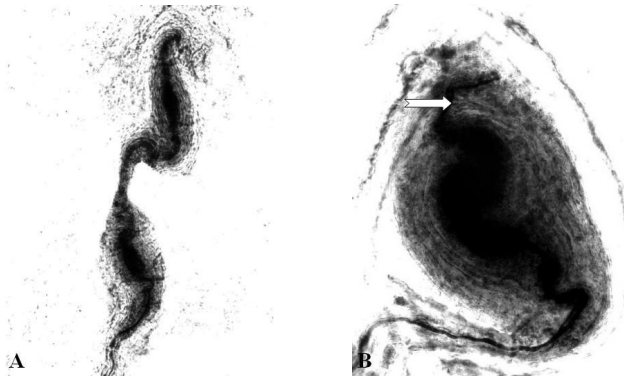


Figure 11 A, B: Coypu: metacarpal (A) and metatarsal (B) pads. The pictures show 2 opposite-polar Pacini corpuscles. The nervous fibre comes out (arrow, B) from corpuscle and sustains another corpuscle that yet disconnected during the isolation. Gold chloride method according to Ruffini modified by Goglia. 120x (A), 250x (B).

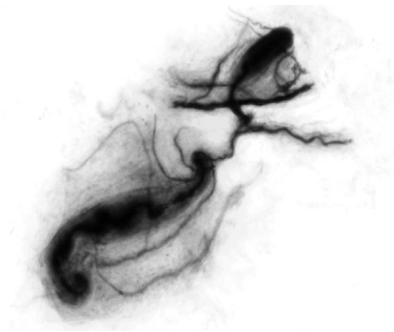


Figure 12: Coypu: metatarsal pad. Poikilomorphous fibre. It divides into 2 branches that innervate 2 corpuscles, morphologically different (Pacini corpuscles on the right, Pacini-like on the left). Gold chloride method according to Ruffini. 70x

Discussion

The presence of an autonomic and sensitive innervation was documented in the digital, metacarpal and metatarsal pads of the coypu, in accordance with that has been already reported (8-9, 13, 15, 17-19, 21-24). Both the component and in particular the autonomic ones, were near the blood vessels and sweat glands as it has been already documented in other anatomic districts (24, 27-32).

The sensitive innervation was represented by the presence of receptors (Pacini, Pacini-like and Golgi-Mazzoni). These corpuscles show the typical structure and can be found isolated or grouped to organize simple and complex flower-sprays, opposite-polar corpuscles and poikilomorphous fibres. They were analogous in the thoracic and pelvic limb. Instead we found numerical differences between the receptors of the metatarsal pad (more numerous) and the metacarpal ones. This finding

could be due to the different involvement of the limbs in the “station” and in the “movement” of the animals studied. In fact, both the pads are surely involved in the support phase, but the metatarsal pads are also involved into the propulsive push of the step. The sensitive nervous component was more conspicuous and located superficially than autonomic ones. In the past, in the pads of human foetuses (13) and in the pads of different mammals species (dog, cat, horse, pig, goat, buffalo, mouse, rat, guinea-pig, opossum) the encapsulated receptors have been documented (3-4, 7, 9, 15, 17, 19, 21-23) but not like that we found. In fact the aforesaid authors have been documented, as a more frequent finding, the Pacini corpuscles and then Golgi-Mazzoni, Pacini-like, Meissner and Ruffini corpuscles.

The Golgi-Mazzoni corpuscles have not been documented by all the aforesaid researchers. In fact these last receptors have been documented in the cat, pig, rat, guinea-pig, and goat (9, 17-19) and have not been documented by Goglia (3-4) in the dog, cat and buffalo, by Giordano and Rosati (6) in the sheep and by Rosati (7) in the horse. In particular, Giordano and Rosati (6) and Rosati (7) have documented, respectively in the pads of sheep and horse, the corpuscles with intermediate characteristics between the Pacini and Golgi-Mazzoni, but they have excluded the presence of the last ones.

We think that an accurate structural analysis allow to define if a corpuscle is a Pacini or Golgi-Mazzoni. Therefore, if it is not possible, the Golgi-Mazzoni corpuscles should be defined as Pacinian-like.

Finally, we also found the poikilomorphous fibres. They are dicotomically branching fibres that terminate with morphologically different corpuscles. Also about these findings, there is not unanimity. In fact some authors refuse the presence of these fibres in the pads of the sheep (6), horse (7), rat and guinea-pig (18). Differently other authors admit the presence of these fibres in the pig (17) and in the goat (19).

In conclusion, we could highlight the casualness of some findings, as the presence of Meissner and Ruffini corpuscles, and the presence of corpuscles morphologically different. Moreover, we could affirm that, in the studied pads, the structural organization of the corpuscle is not so important as their functional role. Therefore, as all the receptors observed are the mechanoreceptors, we think that they perfectly correspond to the role that they have in the digital, metacarpal and metatarsal pads in the dynamic function of the limb.

References

1. Martino L. (1942). Sulla innervazione dell'apparato ungueale. Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 17, 1-3.
2. Lapolla L. (1950). Le espansioni nervose sensitive del derma ungueale filloso del cavallo. Quad. Anat. Prat. 6, 91-100.
3. Goglia G. (1952 a). Sulla innervazione sensitiva dei cuscinetti plantari di alcuni mammiferi (cane e gatto). Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 28, 433-435.
4. Goglia G. (1952 b). Sulla innervazione sensitiva del cheratogeno nel bufalo. Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. 28, 1313-1315.
5. Goglia G. (1953). Sulla innervazione sensitiva del cheratogeno di bue. Boll.

- Soc. Ital. Biol. Sperim. 29, 61-62.
6. Giordano G., Rosati P. (1955). Le espansioni nervose nel cheratogeno degli ovini. *Acta Med. Veterin.* 2, 415-432.
7. Rosati P. (1956). L'innervazione sensitiva del cuscinetto plantare degli equini. *Acta Med. Veterin.* 2, 29-39.
8. Cauna N., Mannan G. (1959). Development and postnatal changes of digital pacinian corpuscles (corpuscula lamellosa) in the human hand. *J. Anat.* 93, 271-276.
9. Malinovský L. (1966). Variability of sensory nerve endings in foot pads of a domestic cat (*Felis ocreata* L., *F. domestica*). *Acta Anat.* 64, 82-106.
10. Malinovský L. (1968). Types of sensory corpuscles common to mammals and birds. *Folia Morphol.* 16, 67-73.
11. Ridley A. (1969). Silver staining of nerve endings in human digital glabrous skin. *J. Anat.* 104, 41-48.
12. Malinovský L. (1970). Ein beitrag zur Entwicklung einfacher sensibler körperchen bei der Hauskatze (*Felis silvestris*, *F. catus* L.). *Acta Anat.* 76, 220-235.
13. Fusaroli P., Roberti Q. A. (1971). Aspetti dei recettori profondi nell'ipoderma della mano e del piede nei feti anencefalici. *Quad. Anat. Prat.* 27, 54 - 67.
14. Lynn B. (1971). The form and distribution of the receptive fields of pacinian corpuscles found in and around the cat's large foot pad. *J. Physiol.* 217, 755-771.
15. Ide C. (1976). The fine structure of the digital corpuscle of the mouse toe pad, with special reference to nerve fibers. *Amer. J. Anat.* 147, 329-356.
16. Asole A., Panu R. (1980). L'innervazione sensitiva dei cuscinetti digitali del suino. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.* 56, 171-172.
17. Palmieri G., Asole A., Panu R. (1980). Sul contingente nervoso sensitivo dei cuscinetti digitali del suino. *Arch. Ital. Anat. Embriol.* 85, 211-219.
18. Panu R., Asole A. (1980). Innervazione sensitiva dei cuscinetti digitali, palmari e plantari del ratto e della cavia. *Arch. Ital. Anat. Embriol.* 85, 363-366.
19. Asole A., Panu R., Sanna L., Farina V. (1982). Presenza di terminazioni nervose sensitive nei cuscinetti digitali della capra. *Quad. Anat. Prat.* 38, 147-152.
20. Malinovský L., Pac L. (1982). Morphology of sensory corpuscles in mammals. *Acta Facultatis Medicae Univers. Brunensis. Purkynië University. Brno.*
21. Cutts H., Krause W. (1983). Structure of the paws in *Didelphis virginiana*. *Anat. Anz.* 154, 329-335.
22. Navarro X., Verdú E., Wendelshafer Crabb G., Kennedy W. R. (1995). Innervation of cutaneous structures in the mouse hind-paw: a confocal microscopy immunohistochemical study. *J. Neuros. Research.* 41, 11-120.
23. Nava P. B., Mathewson R. C. (1996). Effects of the age on the structure of Meissner corpuscles in Murin digital pads. *Microsc. Res. And Techn.* 34, 376-389.

24. Palmieri G., Sanna M., Bo Minelli L., Botti M., Gazza F., Di Summa A., Santamaria N., Passantino L., Maxia M., Acone F. (2003). On the sensitive innervation of the ostrich's foot pads. *Ital. J. Anat. Embryol.* 108, 25-37.
25. Ruffini A. (1897). Observations on sensory nerve endings in voluntary muscles. *Brain.* 20, 368-374.
26. Goglia G. (1965). Sopra una modificazione del metodo aurico di Ruffini per la dimostrazione dei recettori nervosi. *Quad. Anat. Prat.* 18, 40-56.
27. Palmieri G., Carta F., Asole A., Panu R., Piu C., Sanna L., Farina V. (1986). Nerve distribution in bovine episcleral connective tissue. *Quad. Anat. Prat.* 42, 107-113.
28. Acone F., Botti M., Gazza F., Sanna M., Cappai M. G., Bo Minelli L. (2001). Morphological characteristics and distribution of the autonomic and sensitive innervation of the prostate in some animal species. *Ital. J. Anat. Embryol.*, 106, 1-11.
29. Palmieri G., Sanna M., Bo Minelli L., Botti M., Corriero A., Desantis S., Cappai M. G., Acone F. (2003). Further observations on the sensitive innervation of some bird's proctodeum. *Ital. J. Anat. Embryol.*, 108, 241-254.
30. Palmieri G., Cappai M. G., Dessole A. A., Bo Minelli L., Botti M., Gazza F., Corriero A., Desantis S., Acone F. (2004). On some structural features of ovarian ligaments in domestic animals. *Ital. J. Anat. Embryol.* 109, 1-12.
31. Palmieri G., Bo Minelli L., Botti M., Gazza F., Desantis S., Deflorio M., Costa G., Cappai M. G., Acone F. (2005). Autonomic and sensitive somatic innervation of ostrich elbow and knee joints articular capsule. *Ital. J. Anat. Embryol.* 110, 111-123.
32. Palmieri G., Cappai M. G., Costa G., Bo Minelli L., Botti M., Desantis S., Corriero A., Acone F. (2006). Sensitive innervation in the copulatory organ in *Struthio camelus*: comparison to corresponding district in female proctodeum. *Ital. J. Anat. Embryol.* 111, 31-44.

AUDITORY OSSICLES IN THE RUMINANTS: COMPARATIVE MORPHOLOGICAL ANALYSIS WITH THE ANALOGUES FORMATIONS OF HORSE

OSSICINI DELL'UDITO NEI RUMINANTI: ANALISI MORFOLOGICA COMPARATIVA CON LE CORRISPONDENTI FORMAZIONI DELL'EQUINO

Maddalena Botti*, Fabio Secci**, Luisa Ragionieri*,
Angelo Antonio Dessole**, Franca Acone **

PAROLE CHIAVE:

orecchio medio, ossicini dell'udito, ruminanti.

KEY WORDS:

middle ear, auditory ossicles, ruminants.

Riassunto

La ricerca descrive, dal punto di vista topografico e morfologico, gli ossicini dell'udito nei Ruminanti e confronta i dati ottenuti con quelli, riportati in letteratura, per gli Equidi.

I risultati dimostrano che la catena degli ossicini nei Ruminanti ha la stessa topografia descritta per gli Equidi, mentre sostanziali differenze emergono dal confronto dell'analisi morfologica dei singoli ossicini. In particolare queste riguardano la testa ed i tre processi del martello, la lunghezza dei processi dell'incudine, la forma della staffa e la topografia dei suoi processi.

Summary

The research describes the topography and morphology of the Ruminants auditory ossicles of the middle ear and compares them with data reported by literature on Equides.

The results prove that, in Ruminants, the topography of the ossicles chain is the same as in Equides, while the morphology of the individual ossicle shows substantial differences. These differences are, in particular, about the head and the 3 processes of malleus, the length of the processes of incus, the shape of the stapes and the topography of its processes.

*Dept. of Animal Health, University of Parma, Parma, Italy.
Via del Taglio, 8 - 43100 Parma - Tel. 0521.032643 - Fax 0521.032642
e-mail: maddalena.botti@unipr.it

** Dept. Animal Biology, University of Sassari, Sassari, Italy.

Introduction

The chain of auditory ossicles of the middle ear has a fundamental role in the transmission of sound, and therefore in animal behaviour. The different auditive ability of the various species is also due to morphological diversity of the auditory ossicles, of their articulations, and of the associated ligaments and muscles. These differences have already been investigated by many authors (1-7). Aim of the present study is to give a detailed morphological and topographical description of the chain of auditory ossicles in Ruminants and to compare our results with the data reported in literature on Equides.

Materials and methods

The heads of 8 bovines, aging between 8 months and 7 years, and of 8 sheep aging between 4 and 8 years have been taken from the public slaughter-house. The parietal regions have been isolated from both sides of each head. The disarticulation of the temporal bone, with particular attentions to its petrous part, has allowed to reach the middle ear (Fig. 1). The tensor tympani and stapedius muscles have been highlighted and the exact topography of the individual ossicles of the chain has been observed. After excising the muscles, the individual ossicles have been separated and boiled to eliminate the organic parts in excess and to allow a more detailed investigation of their morphology.

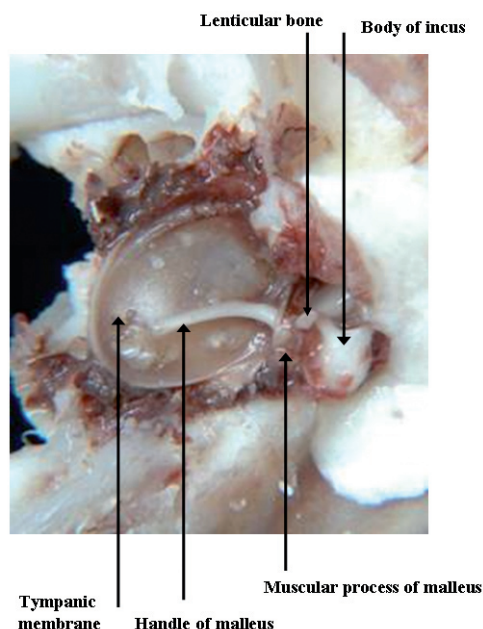


Figure 1: Lateral wall of bovine middle ear: medial view.

Results

The tympanic cavity was lateral-laterally crossed by the auditory ossicles that were in order: the malleus, the incus, and the stapes (fig. 2-4), like normally in the other species.

The malleus, also in Ruminants, was characterized by an handle, a neck and an head (fig. 3-4). The handle was inserted in the medial side of the tympanic membrane in that it determined, with ventro-dorsal direction, an impression: the malleolar strip (stria mallearis). This malleolar strip ended dorsally in the malleolar prominence (prominentia mallearis) that was determined by the lateral process of the neck. The neck followed dorsally the handle and it was thin, flattened and slightly curved medially. The head followed the neck and was oriented in rostro-medial direction. It was almost totally located in the epitympanic recess. The head was elongate and had triangular section, so it was flattened in the caudal side, where it showed two articular surfaces for the body of the incus. The malleus had 3 processes: lateral, muscular and rostral. The lateral process was cone-shaped and it was located in the junction point of handle and neck. This process was in contact with the tympanic membrane, where it defined the malleolar prominence. The rostral process was near the head it was “thorn of rose” shaped (fig. 4).

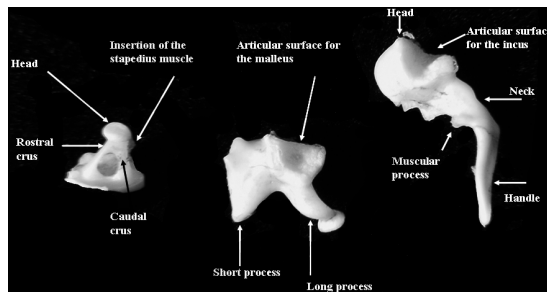


Figure 2:
Horse: auditory ossicles. From the right malleus, incus, stapes.

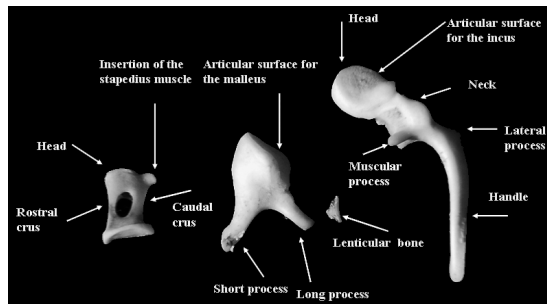


Figure 3:
Bovine: auditory ossicles. From the right malleus, incus, stapes.

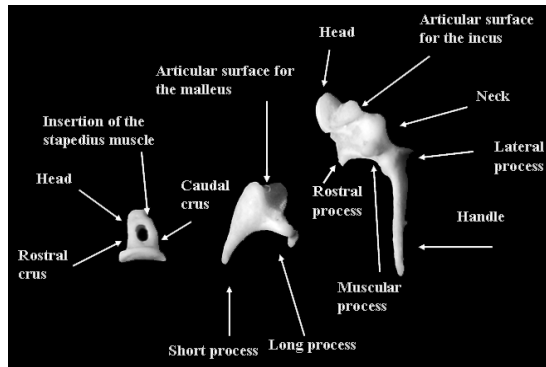


Figure 4:

Ovine: auditory ossicles. From the right malleus, incus, stapes.

It was the insertion point of the rostral ligament of the malleus that linked to the head throughout a transparent bone lamina. The muscular process was located in a medial position. It was digitiform and it gave attack to the tensor tympani muscle.

The incus was the second of the ossicles, proceeding latero-medially. It was totally located in the epitympanic recess and it was characterized by a body and by 2 processes that were very divergent (nearly to a right angle). The body of incus was short, strong and oval-shaped. It had laterally an articular surface for the head of the malleus. From the body originated 2 processes: one long and one short. The long process turned dorso-caudally in the epitympanic recess and it terminated with a thick ligament. This ligament connected the process with the dorsal wall (internal apix) of the recess. The short curve process went medially and terminated with a little lenticular relief that articulated with the head of the stapes. This relief easily fractured during the preparation setting the lenticular bone free.

The stapes showed rectangular shape and was located under the epitympanic recess. It was constituted by an head, a muscular process, 2 crura (rostral and caudal) and a base. The head had oval shape and was located laterally to meet the short process of the incus. The muscular process, for insertion to the stapedius muscle, was located caudally in respect to the head. From this process originated the caudal crus. The rostral crus originated form the head. Between the 2 crura was stretched the stapedial membrane. The base was represented by a little oval plate with major axis caudo-rostrally oriented. It was applied to the vestibular window throught an anular ligament.

Discussion

The ossicle chain in Ruminants has a similar topography in respect to the same chain in the horse. Differently there are some differences in the conformation of the single ossicle.

The head of the malleus, in the Ruminants, was lengthened. It had a trian-

gular section and the articular surface for the incus located caudally. Differently in the horse, the head of the malleus is "... regolarmente sferoidale ad eccezione di una superficie articolare [...] che prende rapporto con l'incudine" (5). Moreover in respect to the horse, the muscular process was more lengthened and more thin and it gave insertion to the tensor tympani muscle (4-5). This muscle ends, in the opinion of Pelagalli and Botte (6) "... sul processo rostrale del manubrio del martello".

The mayor differences regard the incus, that is more thin than the same of the horse even if has the same shape that "... è stata paragonata sovente a un dente bicuspidato umano con radici divergenti" (3). Furthermore, in agreement with Nickel et al (4) the long and short processes had inverted proportions in Ruminants in respect to the horse. In fact, the aforesaid authors say that the short process is more developed in length than the long process. Similarly to the horse, the long process terminates with a discoidal relief, the lenticular process, that articulates itself with the head of the stapes. Our data seem to be confirmed by Nickel et al. (4) who sustain that "... l'estremità della branca lunga è unita per sindesmosi all'osso lenticolare che è molto piccolo ed ha forma sferoidale" while Bortolami and Callegari (5) sustain that in the horse "... il processo lenticolare [...] può rendersi talvolta indipendente, soprattutto a causa di fratture durante la preparazione anatomica, e viene considerato come osso lenticolare."

Finally, we can precise that the equine stapes has isosceles triangle shape with latero-lateral mayor axis. So it resembles to "... quella dell'omonimo arnese usato dai cavalieri" (5). Differently in the Ruminants the stapes had rectangular shape. Moreover in the horse, the caudal crus has a process for the insertion of the stapedius muscle. This process, in the Ruminants, was located on the head.

References

1. Zimmerl U. (1930). Trattato di Anatomia Veterinaria. Editrice Francesco Vallardi, Milano.
2. Bruni A. C., Zimmerl U. (1947). Anatomia degli Animali Domestici. Editrice Francesco Vallardi, Milano.
3. Getty R. (1982). Anatomia degli Animali Domestici di Sisson e Grossman. Piccin Editore, Padova.
4. Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (1988). Trattato di Anatomia degli Animali Domestici. Editrice Ambrosiana, Milano.
5. Bortolami R., Callegari E. (1999). Neurologia ed Estesiologia degli Animali Domestici. Edagricole, Bologna.
6. Pelagalli G. V., Botte V. (1999). Anatomia Veterinaria Sistemica e Comparata. Edi-Ermes, Milano.
7. Bortolami R., Callegari E., Beghelli V. (2000). Anatomia e Fisiologia degli Animali Domestici. Edagricole, Bologna.

THE CRITICAL SIZED BONE DEFECT: MORPHOLOGICAL STUDY OF BONE HEALING

STUDIO MORFOLOGICO DELLA RIPARAZIONE OSSEA IN UN DIFETTO OSSEO CRITICO

Antonio Cacchioli¹, Brunella Spaggiari¹, Francesca Ravanetti¹,
Filippo Maria Martini³, Paolo Borghetti², Carlo Gabbi¹

PAROLE CHIAVE:

tessuto osseo, coniglio, difetto osseo, tibia, riparazione tissutale.

KEY WORDS:

bone tissue, rabbit, bone defect, tibia, tissue healing.

Riassunto

Nel presente lavoro si è voluta investigare la dinamica di riparazione di difetti ossei creati in corrispondenza della faccia mediale dell'epifisi prossimale della tibia di coniglio. Si sono presi in considerazione animali maturi dal punto di vista scheletrico, di diverse età. Dopo un tempo sperimentale di 6 settimane, i segmenti ossei sottoposti all'osteotomia sono stati in parte inclusi in metilmetacrilato per l'osservazione al microscopio in luce polarizzata ed in fluorescenza, ed in parte inclusi in paraffina, previa decalcificazione, per l'osservazione al microscopio ottico. Dall'osservazione dei preparati si è potuto desumere che a questo tempo sperimentale il processo di riparazione del danno indotto è solo parziale e vede la compartecipazione di tessuto osseo primario e tessuto connettivo fibroso e di granulazione. Durante un processo di rigenerazione ossea quello che è importante ottenere è una buona quantità ma soprattutto qualità del tessuto di riparazione relativamente al tempo sperimentale di interesse. Lo studio dei meccanismi di guarigione ossea a brevi tempi sperimentali può essere utile per testare le proprietà osteoconduttive ed osteoinduttive di biomateriali.

Summary

In the present study we investigated the dynamics of healing of bony defects created in medial face of rabbit tibial proximal epiphysis. We took into consideration differently aged skeletally mature animals. After an experimental time of 6 weeks, bone segments undergone osteotomy were partly embedded in methylmethacrylate

¹ Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Anatomia degli Animali di Interesse Medico Veterinario;

² Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria;

³ Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Clinica Chirurgica Veterinaria e Medicina d'Urgenza.

for the observation by polarizing light microscopy and fluorescence microscopy, and partly decalcified and embedded in paraffin for the observation by brightfield light microscopy. After having observed the sections, we could gather that at this experimental time the healing process is partial and involves both primary bone tissue and fibrous and granulation connective tissues. During a bone repair process it is important to obtain satisfactory quantity and quality of the healing tissue related to the experimental end point. The study of bone healing mechanisms at short end points could be useful to test osteoconductive and osteoinductive properties of biomaterials.

Introduction

The evaluation of bone repair dynamics is a basic element in bone morpho-functional study. Active mechanisms of bone deposition and remodelling underlie bone regeneration potential and allow tissue repair when an injury occurs by surgery, various diseases or trauma. In the last decades a suitable animal model was investigated to study bone repair mechanisms (Frame 1980, An et al. 2000).

Among different models, the rabbit model has several advantages, such as standardisation of experimental conditions and experiment repeatability, inexpensiveness and high bone turnover rate. The study of bone regeneration in rabbit was performed taking into consideration different anatomical sites, such as mandible (Kahnberg 1979), femur (Wheeler et al. 2000) and calvaria (Frame 1980, Clokie et al. 2002, Mooney et al. 2001, Vesala 2002), and evaluating repair dynamics after having induced an injury.

The rabbit tibia was used as well by some Authors (Najjar & Kahn 1977, Aaboe et al. 1993, 1994) to create a bone defect. In particular, tibial proximal epiphysis has a medial face which is suitable to induce bone defects, being a wide and slightly convex surface, devoid of muscle insertion. Further to the anatomical site features, a bone defect repair rate is mainly dependent on the bone wound size (Schmitz and Hollinger 1986). Theoretically, an experimental osseous injury performed to study repair mechanisms should be wide enough to preclude a spontaneous healing. In order to do this, the non-regeneration threshold of bone tissue was investigated in the studied models, inducing a so-called critical-sized defect (CSD). The CSD may be defined as “the smallest size intraosseous wound in a particular bone and species of animal that will not heal spontaneously during the lifetime of the animal” (Schmitz & Hollinger 1986, Hollinger & Kleinschmidt 1990). The CSD may be therefore considered the prototype of discontinuity defects, as a condition of failed osteogenesis for overcoming the threshold of physiologic repair processes.

Certainly, the CSD healing should be evaluated correlating wound size with repair period, but above all with the quality of regenerated tissue.

The correlation with the repair period is a basic datum, because healing bone quantity and quality must be evaluated in animal models related to a specific experimental time point, and not as an absolute value. In fact, the best tissue quality should be achieved in the shortest lapse of time, assuming that bone will be remodelled during the whole animal lifetime.

Considering the quality of repair tissue, fibrous connective tissue regenerates

faster than bone tissue, depending upon the faster migration mechanism of fibroblasts than osteoblasts (Hollinger & Kleinschmidt 1990, Mundell et al. 1993, Schmitz & Hollinger 1986, Mooney et al. 1996, Stetzer et al. 2002).

The work of Najjar and Kahn (1977) showed fibrovascular connective tissue as the first repair tissue in a tibial defect in the first weeks after injury, replaced by immature bone in the following weeks, in turn remodelled into mature bone. The Authors used very young animals (aged 3 months) still subject to skeletal growth. To establish the periods and characteristics of bone healing without interfering with the physiological growth process, bone defect repair should be studied in skeletally mature animals. In rabbit the skeletal growth is assumed to coincide with the closure of the epiphyseal plates and to occur at the animal puberty, around 6 months of age (Kilborn et al. 2002).

Further to the defect size, other factors regulate the quality and quantity of bone healing in experimental conditions. As above mentioned, the defect anatomical site and its stability are important, because muscular and load stresses and the degree of mobility can affect the result (Friedenberg and Lawrence 1962). Animal species, bone structure and vascularisation, cortical bone involvement and the presence of periosteum are to be considered as well (Frame 1980, Schmitz & Hollinger 1986, Hollinger & Kleinschmidt 1990, Aaboe et al. 1995).

The data obtained from the evaluation of bone regeneration dynamics could be usefully exploited in clinical practice, when dental or osseous loss of substance occur due to diseases or trauma and need a rapid and functional restoration.

In particular, e.g. during the healing process of bone tissue after orthopaedic and maxillo-facial surgery and after prosthesis implantation, osseous healing needs to be fastened and integrated by biomaterials. In fact, due to biomechanical stress and unbalanced load (Stetzer et al. 2002), the different regeneration rate between bone and fibrous connective tissue can lead to undesired results such as fibrous non-union or fibrous encapsulation of implants (Mundell et al. 1993, Hjørting-Hansen et al. 1995). For this reason, the use of biomaterials is often required to support and integrate bone healing (Haddad et al. 2006, Whang et al. 1999, Service 2000, Shea et al. 2000).

The present work aims at studying bone repair dynamics in two different sized bone defects to contribute to the knowledge of bone healing features and period in an experimentally induced injury.

Materials and methods

Bone healing was studied in defect cavities with diameter of 6 and 8 mm created in the medial face of rabbit tibial proximal epiphysis. After an experimental time of 6 weeks, the healing was assessed radiologically and histologically.

Three adult male White New Zealand rabbits (Stefano Morini, SAS, S.Polo d'Enza RE) (4 ± 0.2 Kg) were used in this study. The animals presented complete closure of the epiphyseal plates, one of them aged 7 months and two aged 13 months. They were housed in 67x60 cm separate cages and fed ad libitum on natural food. Prior and after surgery rabbits were given antibiotic therapy I.M. (Baytril, Bayer,

5 mg/kg) and analgesic therapy S.C. (Rimadyl, Pfizer, 4 mg/kg). The surgical procedure was made in general anaesthesia (Domitor, Pfizer, 0.1 ml/kg; Ketavet 100, Gellini, 0.3 ml/kg; Isoflurane-Vet, Merial) with sterile techniques. The anterior and medial parts of the tibial region were shaved and cleaned with iodopovidone and alcohol. The medial surface of both tibiae was exposed via a skin excision. Care was taken to split the muscular layer by blunt dissection and to keep the periosteum intact apart from the longitudinal excision. Circular unicortical osteotomies, 6 and 8 mm in diameter, were performed in the medial epiphyseal face of left and right tibiae of each animal, respectively. The bone excision of the cortex was cut using a trephine in a dental handpiece with continuous cooling. The defects were allowed to fill with blood clot and the overlying soft tissues were repaired.

Postoperatively, rabbits were given antibiotic and analgesic therapy and therapy for 3 days and were kept on a standard diet and water *ad libitum*.

In order to assess the osteogenic activity, vital fluorochromic bone markers were used, in order to mark the areas of bone growth within the administration period (Rahn and Perren 1971, Rahn 2003, Pautke et al. 2005). Labelling of bone deposition was performed by subcutaneous injections of four fluorescent markers: Calcein Green (CG) (5 mg/Kg b.w., Sigma), Calcein Blue (CB) (30 mg/Kg b.w., Sigma), Tetracycline (TC) (25 mg/Kg b.w., Sigma), Alizarin Red (AR) (15 mg/kg b.w., Sigma). The animals were daily marked with CG in the first week after surgery, with CB in the second week after surgery, with TC in the third week after surgery and with AR in the fourth week after surgery.

6 weeks after surgery animals were pharmacologically euthanised (Tanax, Roussel Hoechst, 0.3 ml/kg/bw) under general anaesthesia (Domitor, Pfizer, 0.1 ml/kg; Ketavet 100, Gellini, 0.3 ml/kg). After the sacrifice, radiographs of the bone segments were taken and both tibial proximal epiphysis were dissected and processed for histological evaluation.

The left segments were processed in full by fixation in 4% paraformaldehyde, dehydration in graded ethanol (70%-100%) and embedding in MMA resin (Osseo-Bed, Polysciences).

From the right segments, the bony lamina containing the defect was delimited and divided in two parts, fixed in 10% formalin, decalcified in EDTA solution, dehydrated in graded ethanol and embedded in paraffin.

Undecalcified bone sections (thickness 50 μ m) were obtained from the resin embedded specimens with a diamond-edged blade in a rotating saw (Leiz 1600), following a sagittal section plane, that is, parallel to the tibial long axis, in order to obtain a frontal vision of defect healing dynamics. These sections were observed by a polarizing light and fluorescence microscope, afterwards they were stained by fast green-toluidine blue-basic fuchsin and observed by light microscopy.

Considering tibial long axis, paraffin bone sections (5 μ m) were cut from each bony lamina parts following both sagittal and transversal section planes. Sections were cut and progressively numbered starting from the endosteal surface and proceeding toward the periosteal surface. Afterwards, they were stained by hematoxylin/eosin and observed by light microscopy.

The histological evaluation was carried out taking into consideration at least

three sections of each explanted undecalcified bone segment and six sections of each decalcified bone segment.

The analysis was performed by means of a light microscope (Nikon Eclipse 90i) with combined visualizing systems of polarized and fluorescent light. The microscope was equipped with a digital camera for microscopic use (Nikon mod. DS-5M) connected to a PC with NIS-Elements Imaging software, version 2.10 (Laboratory Imaging).

Results

During the observation period, animals were healthy and presented no sign of infection. The 7 months aged animal disclosed an unobserved fracture through the 8 mm defect in the right tibia at the time of sacrifice.

Both sagittal and transversal sections showed the dynamics of injury healing in tibial medial face. Six and eight mm bone defects were found to be undergoing a repair process for the involvement of trabecular primary bone tissue and above all of fibrovascular and granulation connective tissues. The defects showed a similar repair dynamics in differently aged animals.

The morphological study of defect healing revealed steady regeneration aspects. In fact, in all examined subjects the regeneration appeared to originate partly from bone wound edges, partly from endostal and periostal surfaces which gave rise to a repair tissue filling the defects from the inside.

In particular, bone tissue proliferated from the tibial cranial portion, corresponding to the tibial crest. This part was located cranially to the bone defect and presented trabecular bone expanding towards the bone wound (figs. 1 and 2). An osseous proliferation could be observed on the caudal face of the osteotomized bone segments as well, assimilable to a periosteal reaction after the injury (fig. 3).

The bony healing was associated to a proliferation of fibrous connective tissue arising from cranial periosteal sheath of medial tibial face.

In the most superficial parts of defect bony lamina, those adjacent to the periosteum, the defect was bridged by a fibrous scar with minimal amount of immature woven bone around the edges of the defect. Fibrous connective tissue originated from the periosteal surface and penetrated inside the osteotomy (fig. 4).

Moving to the inner, endosteal surface, tiny endosteal bony trabeculae filled the defect from the inside, intermixed to fibroadipose tissue and hemopoietic bone marrow (fig. 5). The new bone was present throughout the defect, with high cellular marrow spaces and osteoblasts. It appeared to organize in discrete islands, while a core of fibrous connective tissue always lay in the centre of the osteotomy, without being replaced by bone tissue at this experimental end point.

Bony repair tissue was characterized by woven fibres alamelar fibrous pattern, consistent with an immature primary bone, with primitive haversian spaces deriving from the fusion of newly formed trabeculae. We could therefore observe a spongy, high cellular bone, with osteocytes included in wide lacunae. Trabecular bone remodelling was accompanied by the gradual incorporation of different trabeculae in a single structure. The greater part of isolated fibrovascular spaces progres-

sively became foci for the formation of haversian channels.

Aspects of bone neodeposition with active osteoblastic rows were present, associated to an active remodelling proved by the presence of osteoclastic cells (fig. 6). Bony spicules were intermingled to high cellular bone marrow lacunae and fibroadipose tissue.

The healing tissue appeared to be poorly polarized primary bone, presenting disorderly organization of collagen fibres and HAP crystals. In fact, examining sections under polarizing light microscope, we could observe how the course of collagen fibres and HAP crystals followed its own polarizing pattern, which was distinct from that of surrounding mature bone. New bone deposition lines developed parallel to the osteotomy edges, in some parts seemingly separated by pre-existing surrounding bone (fig. 7).

By fluorescence microscopy, intravital bone markers revealed the process of bone neodeposition and in the examined subjects they reflected the course of bone defect healing process. The positive labelling resulted to be present in various sites around and inside the defect, that is both in the cranial periphery, highlighting trabecular bone proliferating from tibial crest, and inside the bone wound, highlighting regenerating bone tissue. The peripheral fluorescence was positive soon after the defect creation and was revealed by Calcein Green (fig. 8), while the internal fluorescence was revealed by Alizarin Red (fig. 9) at the end of the experimental time.

The markers intensity was low in the primary bone filling the defect, while it was more evident in the external trabeculae, highlighting a reaction of mature surrounding bone. This aspect was consistent with the incomplete calcification of primary bone tissue, whose trabeculae appeared to be thin and tiny and underwent an active remodelling process.

The incomplete calcification of healing bone tissue was evident radiologically, too. In fact, the radiopacity of the osteotomized segment was lower than that of surrounding tissue, even though it drew away from radiotransparency (fig. 10).

Discussion

In the present study we investigated the healing dynamics of bone defects created in the medial face of rabbit tibial proximal epiphyses.

The regeneration process of a bone injury occurs by means of different steps, including the development of granulation tissue associated to the differentiation of osteoprogenitor cells and osteoblasts, which are responsible for primary bone matrix deposition (Landry et al. 1996).

Bone remodelling is a physiological process in which the normal bone deposition is combined to a certain degree of bone resorption by osteoclastic cells. During the remodelling phase, primary bone is replaced by secondary mature bone. Remodelling is a slow process taking place during a long lapse of time, which can get over 4 months (Hjørting-Hansen 1970, Kramer et al. 1968).

The osseous wounds created in the present work resulted to be subject to a partial healing process, even though different tissues were involved in the repair, bone tissue and fibrovascular connective tissue.

Concerning bone tissue, in the initial phases the defect healing process involved the deposition of primary bone, having different structural and functional qualities if compared to the mature surrounding bone. The latter underwent reactivation after the establishment of the tibial injury.

These differences were detectable by brightfield light microscopy on both undecalcified and decalcified sections, where trabeculae of spongy alamar bone could be observed, containing irregularly arranged wide osteocyte lacunae. Collagen fibres and HAP crystals followed their own course as well, so that a clear distinction between new bone and old bone could be made. In fact, bone deposition lines could be appreciated, which were parallel to the osteotomy edges, suggesting that healing tissue mainly arose from periosteal and endosteal sheaths, rather than from wound margins. Sectioning the deepest portion of the osseous defect, the endosteal proliferation seemed to prevail, while a high vascularised fibrous healing originating from the periosteum was predominant in the superficial layer of bone wound.

According to some Authors (Aaboe et al. 1993, Aaboe et al. 1994, Piattelli et al. 1996), the healing of 8 mm bone defects in rabbit tibia would be mainly due to bone tissue. The findings of Piattelli et al., however, indicated the presence of bone associated to connective tissue in the healing of defects after 6 weeks.

At the experimental time of 6 weeks, our findings, if compared to the results of other Authors, showed that the regeneration of 6 and 8 mm bone defects in rabbit tibia occurred for the involvement of immature bony tissue and highly vascularised fibrous and granulation connective tissues, the latter prevailing over bone tissue.

In the concept of "critical sized defect" (Schmitz & Hollinger 1986, Hollinger & Kleinschmidt 1990), further to the entity of repair, that is how much the defect heals, we should keep into consideration the morpho-structural features of the healing tissue. In orthopaedic and maxillo-facial surgery this is related to the necessity to have a functional healing of an osseous injury as quickly as possible.

A 8 mm defect in the medial face of rabbit tibia consists a limit itself for the anatomical localisation, in fact in the youngest animal the creation of a defect caused a fracture. In connection to this it is advisable to use skeletally mature experimental animals.

The clinical applications taking advantage of biomaterials as auxiliary tools to bone healing process would be as successful as faster would be the healing induction. As a consequence, in pre-clinical evaluation of biomaterials short experimental end points should be adequately investigated.

The animal model and the anatomical localization considered in the present work represent a valid model for studying medical prosthesis aiming at improving bone regeneration. In fact, our findings showed that in a short experimental time the healing is partial and involves immature bone tissue and fibrous connective tissue. In these conditions, we would be able to evaluate how a biomaterial could affect the healing process and whether the healing would be satisfactory as far as tissue quantity and quality are concerned, as well as the osteoconductive and/or osteoinductive characteristics of testing materials.

Captions

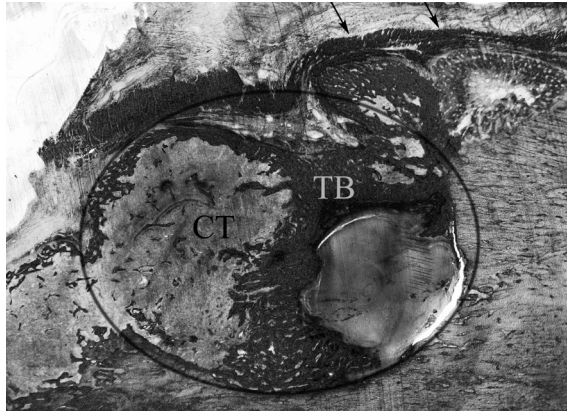


Figure1:

13 months aged rabbit. Six mm bone defect in rabbit tibia medial face. The defect (circle) is bridged by newly deposited trabecular bone (TB) and filled by a fibrous connective tissue scar (CT). Trabecular bone arises from tibial cranial surface (arrows). Undecalcified bone section, trichrome stain. Original magnification 1x.

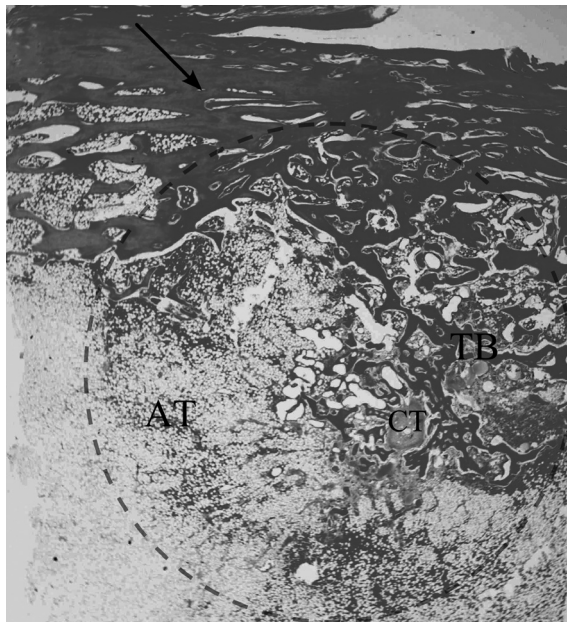


Figure 2:

13 months aged rabbit. Eight mm bone defect in rabbit tibia medial face. Section nr. 33. Trabecular bone (TB) arises from tibial cranial surface (arrow) and penetrates into the defect (circle). CT, connective tissue; AC, adipose tissue. Decalcified bone section, E/E stain. Original magnification 1x.



Figure 3:

13 months aged rabbit. Six mm bone defect in rabbit tibia medial face. A periosteal reaction (arrows) can be observed on the caudal face of the osteotomized bone segment. Undecalcified bone section, trichrome stain. Original magnification 1x.

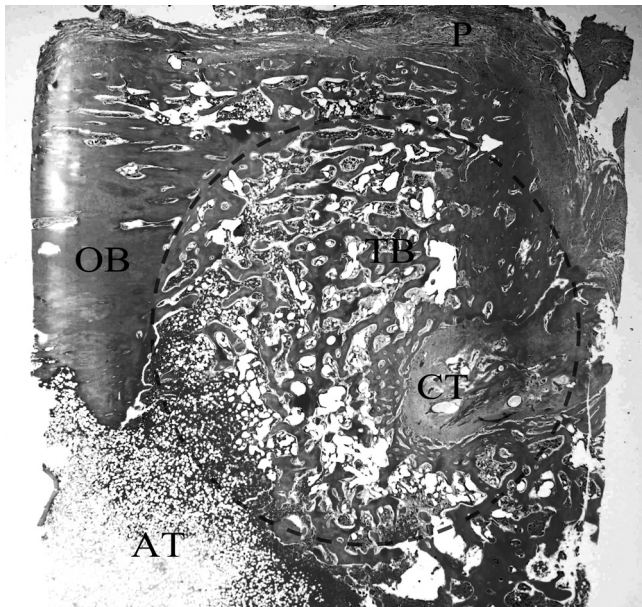


Figure 4:

13 months aged rabbit. Eight mm bone defect in rabbit tibia medial face. Section nr. 80. Fibrous connective tissue (CT) originates from the periosteal surface (P) and penetrates inside the osteotomy (circle). TB, primary trabecular bone tissue; OB, old bone tissue; CT, connective tissue; AT, adipose tissue. Decalcified bone section, E/E stain. Original magnification 1x.

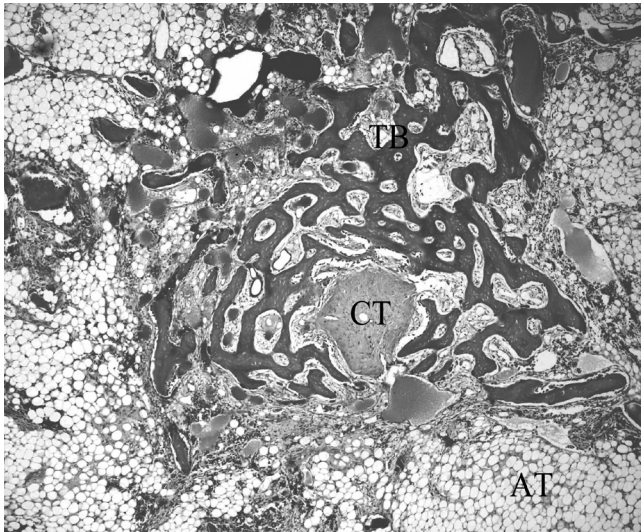


Figure 5:

13 months aged rabbit. Eight mm bone defect in rabbit tibia medial face. Section nr. 97. Tiny endosteal bony trabeculae (TB) fill the defect from the inside, intermixed to fibroadipose tissue. A core of fibrous connective tissue (CT) always lies in the centre of the osteotomy. TB, primary trabecular bone tissue; CT, connective tissue; AT, adipose tissue. Decalcified bone section, E/E stain. Original magnification 4x.

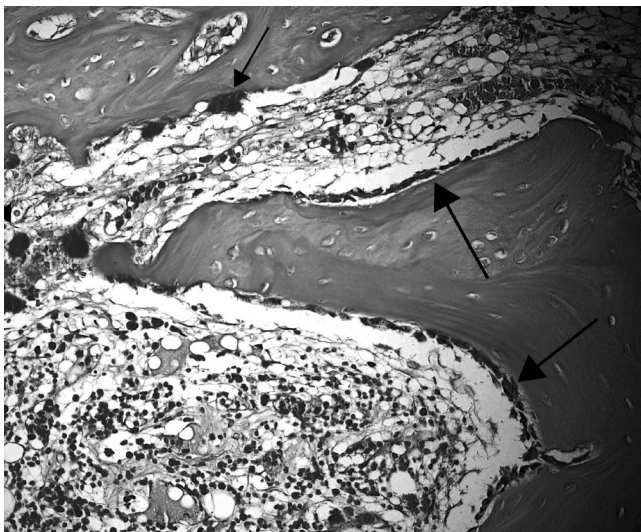


Figure 6:

13 months aged rabbit. Eight mm bone defect in rabbit tibia medial face. Section nr. 97. Active osteoblastic rows (large arrows) reveal bone neodeposition. Primary trabecular bone is remodeled by osteoclasts (small arrow). Bony spicules are intermingled to fibroadipose tissue. Decalcified bone section, E/E stain. Original magnification 10x.

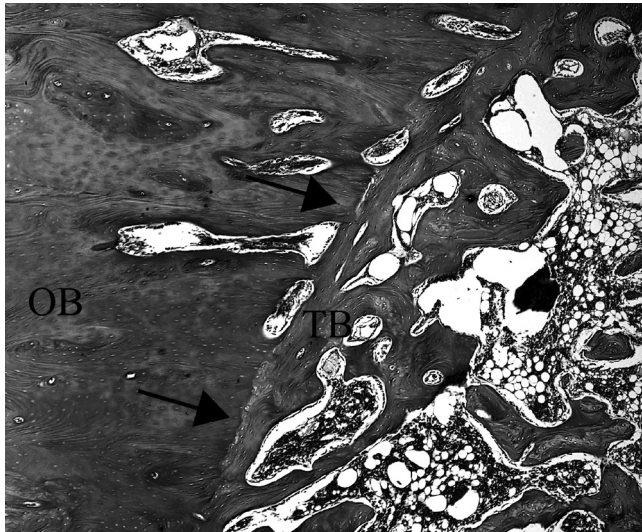


Figure 7:

13 months aged rabbit. Eight mm bone defect in rabbit tibia medial face. Section nr. 80. Healing bone tissue follows its own polarizing pattern, which is distinct from that of surrounding mature bone. New bone deposition lines (arrows) developed parallel to the osteotomy edges, in some parts seemingly separated by pre-existing surrounding bone. TB, primary trabecular bone tissue, OB, old bone. Polarizing microscope. Original magnification 4x.

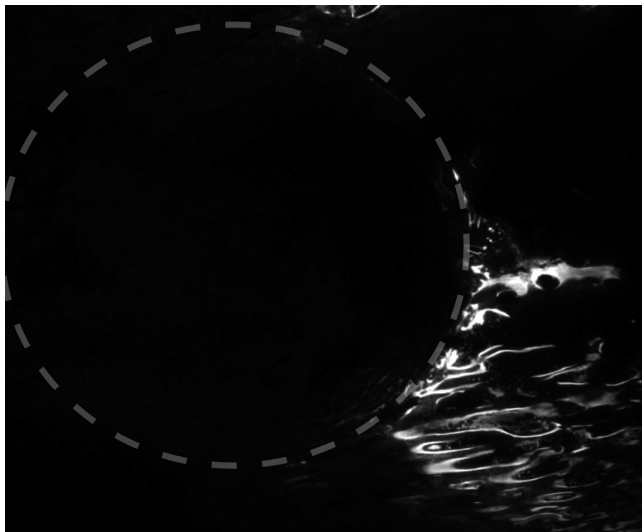


Figure 8:

7 months aged rabbit. Six mm bone defect in rabbit tibia medial face. Calcein Green positive labelling in the cranial periphery of the defect (circle), in correspondence of trabecular bone proliferating from tibial crest. Undecalcified bone section, fluorescence microscopy. Original magnification 1x.

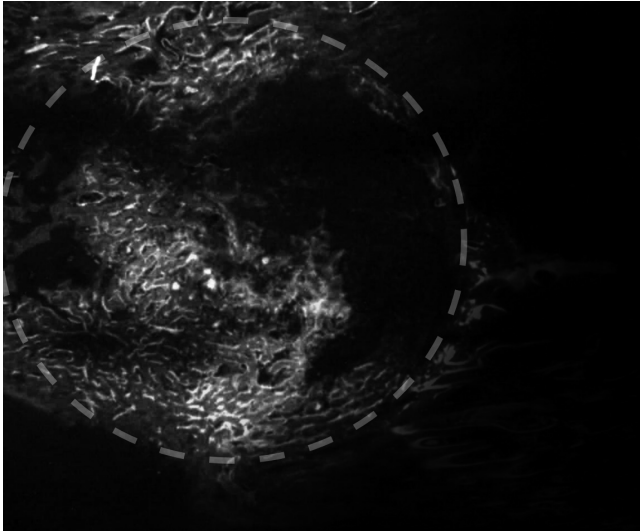


Figure 9:
7 months aged rabbit. Six mm bone defect in rabbit tibia medial face. Alizarin Red positive labelling inside the defect (circle), highlighting healing primary bone tissue. Undecalcified bone section, fluorescence microscopy. Original magnification 1x.

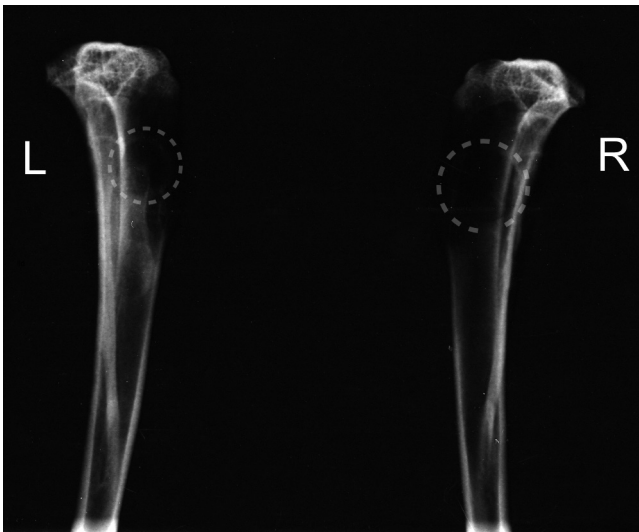


Figure 10:
13 months aged rabbit. Radiograph of left (L) and right (R) tibiae, with 6 and 8 mm defects (circle), respectively. Low radiopacity of osteotomized areas if compared with the surrounding tissue at the end of experimental time.

References

1. Aaboe M., Pinholt E.M., Hjørting-Hansen E. (1994) Unicortical critical size defect of rabbit tibia is larger than 8 mm. *J Craniofac Surg* 5: 201-203.
2. Aaboe M., Pinholt E.M., Hjørting-Hansen E. (1995) Healing of experimentally created defects: a review. *Brit J Oral Max Surg* 33: 312-318.
3. Aaboe M., Pinholt E.M., Hjørting-Hansen E., Solheim E. and Prætorius F. (1993) Guided tissue regeneration using degradable and nondegradable membranes in rabbit tibia. *Clin Oral Impl Res* 4: 172-176.
4. An Y.H., Woolf S.K. and Friedman R.J. (2000) Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials* 21: 2635-2652.
5. Clokie C.M., Moghadam H. Jackson M.T. and Sandor G.K. (2002) Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg* 13: 111-121.
6. Frame J.W. (1980) A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surgery* 38: 176-180.
7. Friedenbergh Z.B. and Lawrence R.R. (1962) The regeneration of bone in defects of varying size. *Surg Gynecol Obstet* 114:721-726.
8. Haddad A.J., Peel S.A.F., Clokie C.M.L. and Sándor G.K.B. (2006) Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogenic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg* 17: 926-934.
9. Hjørting-Hansen E. (1970) Studies on implantation of anorganic bone in cystic jaw lesions. Copenhagen, Munskgaard.
10. Hjørting-Hansen E. and Andreasen J.O. (1971) Incomplete bone healing of experimental cavities in dog mandibles. *Brit J Oral Surg* 9: 33-40.
11. Hjørting-Hansen E., Helbo M., Aaboe M., Gotfredsen K. and Pinholt E.M. (1995) Osseointegration of subperiosteal implant via guided tissue regeneration. *Clin Oral Impl Res* 6: 149-154.
12. Hollinger J.O and Kleinschmidt (1990) The critical size defect as an experimental model to test bone repair methods. *J Craniofac Surg* 1: 60-68.
13. Kahnberg K. (1979) Restoration of mandibular jaw defects in the rabbit by subperiostally implanted Teflon® mantle leaf. *Int J Oral Surg* 8: 449-456.
14. Kilborn S.H., Trudel G. and Uhthoff H. (2002) Review of growth plate closure compared with age at sexual maturity and lifespan in laboratory animals. *Contemporary topics* 41: 21-26.
15. Kramer I.R., Killey H.C. and Wright H.C. (1968) The response of the rabbit to implant of processed calf bone (boplast). *Arch Oral Biol* 13:1263-1273.
16. Landry P.S., Marino A.A., Sadasivan K.K. and Albright J.A. (1996) Bone injury response. *Clin Orthop Relat R* 332:260-273.
17. Mooney M.P and Siegel M.I: Animal models for bone tissue engineering of critical-sized defects (CSDs), bone pathologies and orthopedic disease states. In: Hollinger J.O., Einhorn T.A., Doll B.A. and Sfeir C., eds.: *Bone tissue engineering*; CRC Press, Boca Raton London New York Washington D.C., 2005, pp. 217-244.
18. Mooney M.P., Mundell R.D., Stetzer K., Ochs M.W., Milch E.A., Buckley

- M.J. and Siegel M.I. (1996) The effects of guided tissue regeneration and fixation technique on osseous wound healing in rabbit zygomatic arch osteotomies. *J Craniofac Surg* 71: 46-53.
19. Mooney M.P., Burrows A.M., Smith T.D., Losken H.W., Opperman L.A., Dechant J., Kreithen A.M., Kapucu R., Cooper G.M., Ogle R.C. and Siegel M.I. (2001) Correction of coronal suture synostosis using suture and dura mater allografts in rabbits with familial craniosynostosis. *Cleft Pal Craniofac J* 38: 72-91.
20. Mundell R.D., Mooney M.P., Siegel M.I. and Losken A. (1993) Osseous guided tissue regeneration using a collagen barrier membrane. *J Oral Maxillofac Surg* 51: 1004-1012.
21. Najjar T.A. and Kahn D. (1977) Comparative study of healing and remodeling in various bones. *J Oral Surgery* 35: 375-379.
22. Pautke, C., S. Vogt, et al. (2005) Polychrome labeling of bone with seven different fluorochromes: enhancing fluorochrome discrimination by spectral image analysis. *Bone* 37: 441-445.
23. Piattelli A., Scarano A., Russo P. and Matarasso S. (1996) Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresorbable and non-resorbable membranes. *Biomaterials* 17: 791-796.
24. Rahn, B. A. (2003) Fluorochrome labelling of bone dynamics. *Eur Cells and Mater* 5(2): 41.
25. Rahn, B. A. and S. M. Perren (1971) Xylenol Orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues. *Stain Technol* 46(3): 125-129.
26. Schmitz J.P. and Hollinger J.O. (1986) The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat R* 205: 299-308.
27. Service R.F. (2000) Bone remodeling and repair. *Science* 289: 1421-1640.
28. Shea L.D., Wang D., Franceschi R.T. and Mooney D.J. (2000) Engineered bone development from pre-osteoblast cell line on three-dimensional scaffolds. *Tissue Eng* 6: 605-617.
29. Stetzer K., Cooper G., Gassner R., Kapucu R., Mundell R. and Mooney M.P. (2002) Effects of fixation type and guided tissue regeneration on maxillary osteotomy healing in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 60: 427-436.
30. Vesala A.L. (2002) Bone tissue engineering: treatment of cranial bone defects in rabbits using self-reinforced poly-L,D-lactide 96/4 sheets. *J Craniofac Surg* 13: 607-613.
31. Whang K., Healy K.E., Elenz D.L., Nam E.K., Tsai D.C., Thomas C.H., Nuber G.W., Glorieux F.H., Travers R. and Sprague S.M. (1999) Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. *Tissue Eng* 5: 35-51.
32. Wheeler D.L., Eschbach E.J., Hoellrich R.G., Montofort M.J. and Chamberland D.L. (2000) Assessment of resorbable bioactive material for grafting of critical-size cancellous defects. *J Orthop Res* 18: 140-148.

MORPHOLOGY AND BIOMECHANICS OF THE SHEEP (*Ovis aries*) POPLITEUS MUSCLE: PRELIMINARY OBSERVATIONS

MORFOLOGIA E BIOMECCANICA DEL MUSCOLO POPLITEO NELLA PECORA (*Ovis aries*): OSSERVAZIONI PRELIMINARI

Palumbo Piccionello A.*, Bo Minelli L.[°], Gazza F.[°], Botti M.[°], Volta A.[^], Panu R.[°], Del Bue M.*

PAROLE CHIAVE:

muscolo popliteo, pecora, morfologia, biomeccanica.

KEY WORDS:

popliteus muscle, sheep, morphology, biomechanics.

Riassunto

Gli Autori hanno studiato la morfologia e le caratteristiche biomeccaniche del muscolo popliteo nella pecora.

La dissezione ha messo in evidenza come il muscolo popliteo origina con un robusto tendine dal condilo laterale del femore, in una posizione craniale rispetto all'asse di rotazione del condilo stesso; inoltre il ventre del muscolo presenta delle lamine connettivali sulle quali si inseriscono fasci muscolari che presentano decorsi differenti.

I risultati delle valutazioni biomeccaniche sembrano escludere una azione flessoria del muscolo popliteo della pecora; sarebbe primaria la funzione stabilizzatrice dell'articolazione del ginocchio. L'intrarotazione della tibia sul femore durante il movimento di flessione del ginocchio, inoltre, sarebbe dovuta ad una azione esclusivamente passiva come documentato dalla tensione del tendine del muscolo popliteo durante la flessione meccanicamente indotta e dalla decrescita del grado di rotazione interna dopo resezione completa del tendine.

Summary

The Authors studied the morphology and the biomechanics of the popliteus

Dept. of Animal Health; [°]Sect. of Anatomy of Animals Veterinary Medicine Interest, *Sect. of Veterinary Surgery and Critical Care, [^]Sect. of Radiology and Diagnostic Imaging; University of Parma, Italy.

Angela Palumbo Piccionello

Sect. of Veterinary Surgery and Critical Care - Dept. of Animal Health

Faculty of Veterinary Medicine - Via del Taglio, 8 - 43100 Parma - 0521 032780

Email: pangelap@libero.it

muscle in the sheep. The dissection showed as the popliteus muscle originates with a sturdy tendon from the lateral femoral condyle, in a cranial position regarding the spin axis of the lateral condyle; moreover the muscle belly has connective layers on which are inserted muscular fibers that have different courses. Biomechanic appraisals seems to exclude a flexor function of the popliteus muscle in the sheep; the stabilizing function of the knee joint would be primary. The internal rotation of the tibia on the femur, during the flexion of the knee, moreover, would be due to an exclusively passive action as documented from the tendon tension of the popliteus muscle during the mechanically induced flexion and from the reduction of the internal rotation after the complete tendon resection.

Introduction

The popliteus is a muscle of the pelvic limb located on the lateral part of the stifle joint and on the caudal side of the leg. On the basis of its topography and its relations it would be in the group of leg flexor muscles (1-6). Indeed, the popliteus muscle and its tendon seem to carry out more complex tasks. On this subject the popliteus muscle has been object of study in many species like dog, pig, horse, sheep and man, to define its involvement in the biomechanics of the stifle. In particular some authors have assumed that it acts like stabilizer of aforesaid articulation (7-11); other authors have speculated that it intra-rotates the tibia on the femur (7; 12-18). With the present research, Authors intended to study from a morphologic and biomechanical point of view the popliteus muscle in a species, the sheep, that is also considered a valid model for the orthopedic studies in man (19-21).

Materials and methods

The research has been carried out on four right pelvic limbs of 35 kg weight just slaughtered sheep. Before the sacrifice it has been estimated the angle of the stifle in the normal station animal. In the skin of the thigh, in correspondence of the femur greater trochanter and lateral condyle, and in the skin of the leg, in correspondence of the tibial lateral condyle and the lateral malleolus, adhesive markers have been fixed. Then, on photographs, the points before indicates have been connected (fig. 1) and therefore the relative measurement have been made.

On the alive animal, moreover, angles of maximum flexion and extension of the stifle have been found to use them as reference for the execution of the passive mechanically induced movements on the pelvic limbs of the slaughtered animals. In every limb, the relationships between the various muscular plans have been at first considered, therefore, after removal of superficial muscles, the popliteus muscle has been isolated.

In every sample the muscle is observed in order to define the morphologic and biomechanical characteristics in the different positions of the knee.

The various observations have allowed to document:

- the angle of the stifle joint in alive animals;
- the morphology of the popliteus muscle and its tendon;

- the tension modification of popliteus muscle tendon during the flexo-extension mechanically induced movements of the articulation with the application of markers to its origin and its ending;
- the degree of intra-rotation of the tibia on the femur during movements of flexo-extension of the articulation:
 - a) with integral tendon;
 - b) after complete resection of the tendon.

The spin degree has been estimated quantitatively, by means of a home-made device realized by the authors, constituted from a goniometer and from two Kirschner wires drilled respectively in the femur and in the tibia on the sagittal plan (fig. 2a, b).

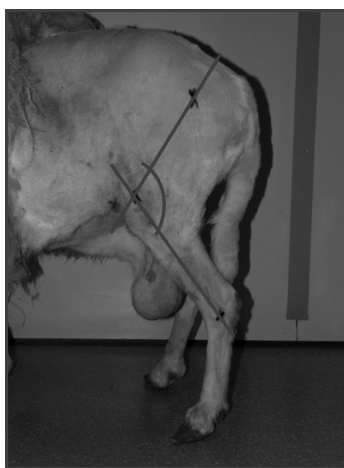


Figure 1: knee joint angle, measured on standing sheep.

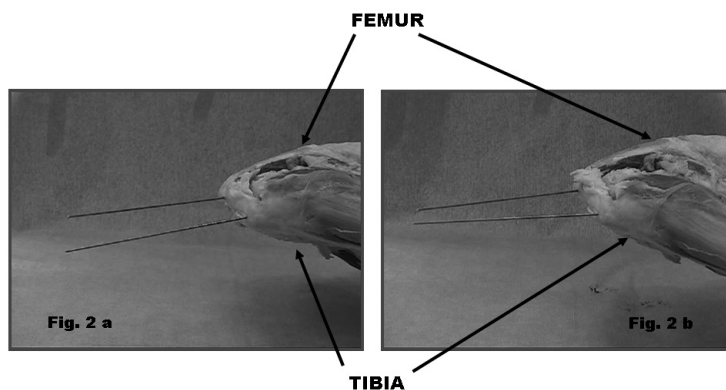


Figure 2: rotation of the tibia on the femur during flexo-extension mechanically induced movements with integral popliteus muscle tendon (PMT) (a) and after complete resection of PMT (b).

Results

The articular angle of the knee, estimated on healthy standing sheep, has turned out in average 103° (fig. 1). This measurement has been used like reference to induce mechanically different movements of flexo-extension in the limbs of slaughtered sheep.

Morfology of popliteus muscle

The popliteus muscle originates with a sturdy tendon from the lateral femoral condyle that, in the sheep, has an evident ellipsoidal shape. The origin of the tendon on the condyle is cranial regarding the proximal insertion of the lateral femur-tibial collateral ligament (fig. 3a) and therefore is placed cranial to the spin axis of the condyle.

The tendon runs under lateral collateral ligament, on the lateral side of the knee joint (fig. 3b), it sends connectival layers to the external border of the lateral meniscus (fig. 4a), it turns to the popliteus incision of the tibia and it is splits up in the muscular belly. The belly is triangular and it expands on the medial surface of the caudal side of the tibia. The muscle is crossed from connective layers on which are inserted the muscular fibers.

Muscular fibers have different courses, in fact, in the lateral portion of the belly, they have a rectilinear course with proximo-distal direction, in the medial portion of the muscle, instead, it is possible to distinguish three areas: a proximal area where the fibers are rectilinear, a central area where they are oblique and a distal area where they are vertical (fig. 4b).

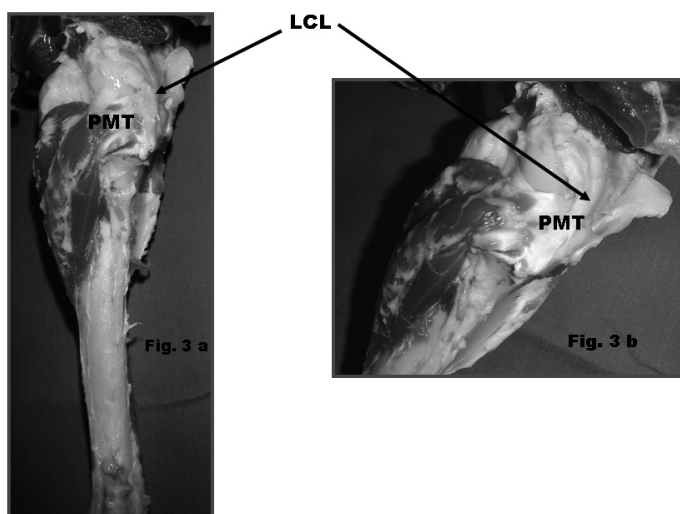


Figure 3: pelvic right leg: origin of popliteus muscle tendon (PMT), lateral-caudal (a) and lateral (b) views. LCL: lateral collateral ligament.

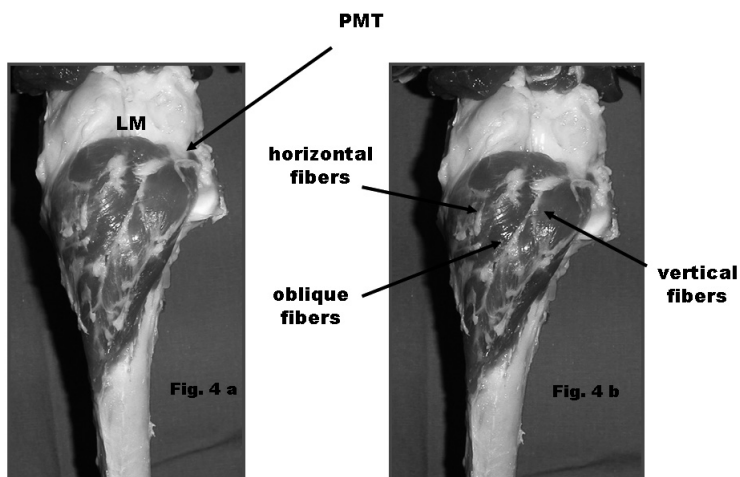


Figure 4: pelvic right leg, caudal views: characteristics of popliteus muscle tendon (PMT) (a) and course of muscular fibers in the muscle belly (b). LM: lateral meniscus.

Modification of the tendon tension during articular movements

During the mechanically induced flexion of the stifle joint, the tendon is gradually stretched, like testified from the markers that they go away.

Degree of intra-rotation of the tibia on the femur

During the mechanically induced flexion of the knee joint, it is observed a intra-rotation of the tibia on the femur of an average of 22°; after complete resection of the tendon the rotation decreases to 15° (fig. 2a, b).

Discussion and conclusion

The observations of the popliteus muscle allowed to formulate some anatomo-functional hypotheses. The morphologic characteristics, the topography and mechanically induced movements would carry to exclude, also in the sheep, the involvement of the popliteus muscle in a flexor function. Mechanical closure of the knee joint, in fact, shows a tension of popliteus muscle tendon due to a femoral lateral condyle rotation and to a raising of the proximal insertion of the popliteus muscle itself. Therefore, an eventual contraction of the popliteus muscle would oppose to a leg flexion.

The tendon and the connective layers of the popliteus muscle belly anextension, besides, might cause an intra-rotation of the tibia on the femur, as in analogy with assume from Fuss (15, 16) for man, dog and pig and from Bo Minelli et al. (17) for the horse. Therefore the tibial intra-rotation would be due to a mechanical action and not to an active contraction of the muscle.

This hypothesis seems to be confirmed also from the experimental observa-

tions. In fact, the complete resection of the tendon causes a lessening of the intra-rotation of the tibia on the femur.

In conclusion, the authors assume that the popliteus muscle performs an active stabilizing action on the stifle movements, in agreement with found in literature (7-11).

Further observations carried out with clinical evaluations, with the aid of the electromyography and the study of the gait analysis, will be turned to estimate the active and co-ordinate action of the popliteus muscle with the other muscles that act on the articulation of the stifle.

Bibliography

1. Getty R. (1982) *Anatomia degli animali domestici*, vol. 1. Piccin Editore, Padova.
2. Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (1991) *Trattato di Anatomia degli Animali Domestici*, vol. 1. Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
3. Pelagalli G.V., Botte V. (1999) *Anatomia Veterinaria Sistematica e Comparata*, vol. 1. Edi-Ermes, Milano.
4. Barone R. (2004) *Anatomia Comparata dei Mammiferi Domestici*, vol. 2 - parte II Edagricole, Bologna.
5. Dyce K.M., Sack W.O., Wensing C.J.G. (2002) *Textbook of Veterinary Anatomy*. Ed Saunders, London.
6. König H.E., Liebich H.G. (2006) *Anatomia dei Mammiferi Domestici*, vol. 1. Ed. Piccin, Padova.
7. Basmajian J.V., Lovejoy J.F. (1971) Functions of the popliteus muscle in man. *J. Bone and Joint Surgery*. 53 A, 3: 557-562.
8. Poliacu Prosè L., Steketee A., Van Zutphen M.H. (1991) The popliteus muscle - The architecture, innervation and insertions. *Proceeding of the 148th Meeting Anat. Soc.*: 108-109.
9. Scherer M.A., Metak G., Anatzberger H., Muller-Gerbl M., Raschke M., Herfeldt K. (1996) Lesions of the popliteus system and their significance for the stability of the knee joint. *Zentralbl. Chir.* 121 (7): 591-598.
10. Ulrich K., Kruidwig W.K., Ulrich W. (2002) Posterolateral aspect and stability of knee joint. 1. *Anatomy and functions of the popliteus muscle tendon unit: an anatomical and biomechanical study*. *Knee Sur. Sports Traumatol., Arthrosc.* 10: 86-90.
11. Nyland J., Lachman N., Kocabey Y., Brosky J., Altun R., Caborn D. (2005) Anatomy, function and rehabilitation of the popliteus musculotendinous complex. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* 35(3): 165-179.
12. Lovejoy J.F., Harden T.P. (1971) Popliteus muscle in man. *Anat. Rec.* 169: 727-730.
13. Herley J.D. (1977) An anatomic-arthrographic study of the relationships of the lateral meniscus and the popliteus tendon. *Am. J. Roentgenol.* 128: 181-187.
14. Mann R.A., Hagy J.L. (1977) The popliteus muscle. *J. of Bone and Joint*

- Surgery 59A: 924-927.
15. Fuss F.K. (1989) An analysis of the popliteus muscle in man, dog and pig with a reconsideration of the general problems of muscle function. *Anat. Rec.* 225: 251-256.
 16. Fuss F.K. (1992) Principles and mechanism of automatic rotation during terminal extension in the human knee joint. *J. Anat.* 180: 297-304.
 17. Bo Minelli L., Sanna L., Gazza F., Acone F., Panu R. (1993) Muscolo popliteo del cavallo: aspetti morfologici, innervazione sensitiva ed ipotesi funzionale. *Atti S.I.S.Vet.* 47:115-117.
 18. Ferrari I.A., Wilson D.R., Hayes W. (2003) The effect of release of the popliteus and quadriceps force on rotation of the knee. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 412: 225-233.
 19. Bosch U., Decker B., Moller H.D., Kasperczyk W.J., Oestern H.J. (1995) Collagen fibril organization in the patellar tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction. A quantitative evaluation in a sheep model. *Am. J. Sports Med.* 23: 196-202.
 20. Moeller H.D., Bosch U., Decker B. (1995) Collagen fibril diameter distribution in patellar tendon autografts after posterior cruciate ligament reconstruction in sheep: changes over time. *J. Anat.* 187; 161-167.
 21. Durselen L., Claes L., Ignatius A., Rubenacker S. (1996) Comparative animal study of three ligament prostheses for the replacement of the anterior cruciate and medial collateral ligament. *Biomaterials* 17; 977-982.

PERFORMANCE TEST OF BARDIGIANO BREED STALLIONS AND MARES FOR SADDLE AND HARNESS SERVICE

PROVE ATTITUDINALI DI STALLONI E FATTRICI DI RAZZA CAVALLO BARDIGIANO PER IL SERVIZIO DA SELLA E DA ATTACCO

Antonio Lucio Catalano, Francesca Martuzzi, Stefano Filippini, Franca Vaccari Simonini

PAROLE CHIAVE:

cavallo, stalloni, fattrici, prove attitudinali.

KEY WORDS:

horse, stallions, mares, performance test.

Riassunto

La razza Bardigiana è un'antica popolazione delle montagne della regione Emilia, allevata un tempo per la produzione della carne e per il lavoro. Recentemente lo standard di razza è stato cambiato per ottenere cavalli più alti e più leggeri, così come richiesto dal mercato, per il servizio da sella e da tiro leggero. Scopo del lavoro è di descrivere i risultati delle prove condotte per determinare l'attitudine della razza per questi nuovi impieghi. Sono stati valutati 37 stalloni e 32 fattrici di 3 anni di età. I cavalli erano alloggiati in un centro ippico, nelle stesse condizioni ambientali riguardo l'alimentazione, i ricoveri e l'addestramento, con la differenza che questo durava 3 mesi per gli stalloni e 2 mesi per le fattrici. Dopo 2 giorni di adattamento, i soggetti erano sottoposti alla prima prova, che comprendeva le misurazioni, l'esame degli arti, delle andature e dello stato di salute. Contemporaneamente venivano considerati anche gli aspetti comportamentali. I cavalli venivano poi addestrati per il servizio da sella e da attacco e ogni mese veniva controllata la risposta all'addestramento. L'elaborazione dei dati raccolti durante le prove ha evidenziato una naturale predisposizione all'addestramento e un rapido miglioramento di tutti i punteggi, dimostrando una buona attitudine della razza al servizio da sella e un'eccellente predisposizione all'attacco. Le fattrici, pur sottoposte ad un addestramento più breve, hanno ottenuto punteggi simili a quelli degli stalloni, evidenziando così una maggiore docilità e facilità di apprendimento. Gli allevatori dovrebbero tuttavia produrre più soggetti castrati, per

soddisfare la richiesta del mercato di cavalli idonei per il servizio.

Summary

Bardigiano Horse is an ancient breed of the mountains in Emilia region, once bred for meat production and work. Recently the breed standard was changed in order to obtain lighter and taller horses as required by the market for riding and light draft services. Aim of this paper is to describe the results of the trials carried out to assess the breed aptitude for these new purposes. 37 stallions and 32 mares, all 3 years old, were evaluated. The horses were housed in a riding centre in the same environmental conditions for feeding, housing and training, except that the trial lasted 3 months for the stallions and 2 months for the mares. After 2 days of adaptation, the horses underwent the first test, including body measurements and examination of limbs, gaits and general health state. Besides behaviour traits were considered. The horses were trained for riding and driving service and every month assessed for response to training. Processing of the data collected during all trials showed natural predisposition to training and fast improving of all scores, demonstrating fair aptitude of the breed to saddle service and excellent predisposition to harness service. Mares even though trained for a shorter period, obtained results similar to those of the stallions, evidencing therefore more docility and learning easiness. However, breeders should produce more geldings for the market demand of leisure horses.

Introduction

Bardigiano Horse is an ancient pony breed of the Apennine mountains between Emilia-Romagna, Toscana and Liguria regions, once bred for meat production and work.

This equine population, due to many crosses with other breeds, was losing its typical traits, until it was recuperated by the Parma Breeders Association in collaboration with the Piacenza, Genova, La Spezia and Massa Carrara Breeders Association, the Mountain Communities of Parma and Piacenza, who saved it from extinction and contamination with other breeds.

In Parma province it is the most widespread equine population. It was officially recognized on the 2nd of August 1977 with a ministerial Decree, approving its selection and Stud Book rules (1). At present, 3240 Bardigiano horses are enrolled in the Stud Book: 140 stallions, 1800 mares and 1300 young horses, controlled and evaluated during annual horse shows, held in the principal towns of the breeding area. 750 breeders are present in 45 Italian provinces.

The Central Office of the Stud Book considered that obtaining a specific demand by the market for this breed was a necessity, otherwise the rearing of many mares was becoming no more convenient for the breeders and the breed could have been endangered. With this aim, in the years nineties the Central Office of the Stud Book studied new selection goals to target more markets, considering that recreational trail riding and light draft might become the employments that better suit the Bardigiano horse characteristics (2, 3).

In Italy there is a strong demand of service horses, in particular ponies, not only for competitions, but also for leisure riding. This need at present is mainly satisfied by importations. Therefore, Bardigiano breed standard was changed in order to obtain lighter and taller horses as required by the market for riding and light draft use. Withers height (expressed in cm) together with other longitudinal measurements, were therefore the first traits considered and the horses were genetically evaluated and selected for withers height. Genetic evaluation is based on a BLUP-Animal Model procedure (4), like in other horse Italian breeds: *e.g.* Haflinger, Italian Heavy Draught Horse (5, 6). Afterwards, both Studbook and the Italian Breeders Research Office realised that a selection involving also other body conformation traits could be a great step ahead for a more complete improvement of this breed for the aimed selection goals. For this reason AIA Research Office studied and developed a new selection index, called *Genetic Global Index (IGG)* adding to withers height other traits recorded in the morphologic linear evaluation by Studbook (7, 8).

Besides the genetic indexes for the morphological traits, another useful instrument to achieve the selection goals of the breed is the Performance Test, that delivers early information regarding the predisposition for the considered disciplines (9). Aim of this paper is to show the results of the trials carried out to assess the aptitude of the breed for riding and light draft.

Materials and methods

37 stallions and 32 mares, 3 years old, were housed in a riding centre in the same conditions for feeding and housing. After 2 days of adaptation to the new environment after their arrival, the horses underwent the first test, consisting in an in-hand evaluation during which body measurements were taken, soundness in general and limbs were examined. A first evaluation of temperament and character was carried out. Showing the horse by hand, correctness of gaits was examined. Males underwent a fertility test.

Afterwards the stallions were trained by specialized instructors for 3 months, while the mares for 2 months. The training was aimed to saddle and harness service.

Every month the horses were tested for free jump and dressage. A driving test was conducted the 3rd month.

The trials were performed as follows:

- free jump: driven from behind with a whip, the unmounted horse was directed to jump three times
- dressage: the mounted horse was presented in a riding pen and performed walk, trot, canter in both directions and executed 20-meter circles to demonstrate willingness and rideability.

Scoring was calculated giving numerical values to the following nine categories:

Trainability:

- tractability during grooming and handling
- stable manners
- acceptance of bridle and saddle, rideability

Gaits:

- confidence, easiness of gaits
- quality of movement, balance
- elasticity, stride width

Temperament:

- impulsion, willingness to go forward
- submissiveness
- attention and trust

Scoring within the categories was as follows:

0-49 insufficient; 50-59 scarce; 59-69 sufficient; 70-79 good; 80-89 very good; 90-100 excellent. The score for “trainability” was calculated by averaging three subscores: tractability during grooming, stable manners, acceptance of bridle and saddle and rideability. The score for “gaits” was derived by averaging: confidence and easiness, quality of movement and balance, elasticity and stride width. The score for “temperament” was calculated by averaging: impulsion and willingness to go forward, submissiveness, attention and trust.

Results and discussion

Body measures of stallions and mares are reported in table 1. Bardigiano Horse is a pony breed, with an average withers height of 142 cm for the stallions and 139 cm for the mares.

A progressive and constant improving of the scores was observed during the three months of the performance test. In particular the scores of free jumping tests showed the most considerable improvement during the training period. The highest scores were gained in the driving test by the stallions, with a mean of 84.75 (fig.1).

Correlations between main body measures and scores of gait evaluations and free jumping of stallions, taken during the 3rd month's test, are shown in table n° 2. In a first trial, carried out on 20 stallions, a negative correlation was observed between shoulder length and free jumping score ($-0.507 P<0.05$) and between hearth girth and free jumping score ($-0.476 P<0.05$) (10). In the present trial, on a larger number of animals, 37 stallions, a negative correlation between shoulder length and free jumping score was found again ($-0.370 P<0.05$), and also a negative correlation between hearth girth and free jumping score, even if not significant (-0.141 NS) confirming what observed before. Shoulder length is a measure that increases also with the muscular mass of this area in the more brachymorphic subjects: in this breed a wider hearth girth and shoulder length often indicate a heavier frame, not favourable for jumping. The subjects with a rounder conformation, typical of the “old” Bardigiano horses, showed indeed more difficulties in the motion and in the coordination needed for the sport performance. Shoulder length showed a positive correlation with the score of “gaits: confidence and easiness” ($+0.973 P<0.01$). This was the only positive correlation found between the traits considered in this table (Tab. n° 2).

Correlations between the scores of gait and temperament evaluations and the scores of trainability, free jumping and driving tests of stallions, taken during the 3rd month's test, are shown in table n° 3. Taking in account only significant correlations,

trainability shows a positive correlation with confidence and easiness of gaits (+0.966 $P<0.01$): likely, animals with a temperament more quiet in barn and during handling show also suppler, less “contracted” gaits during a normally stressful event. Free jumping score is positively correlated with gait elasticity and stride width (+0.497 $P<0.01$) and with impulsion, willingness to go forward (+0.353 $P<0.05$). Correlations between gaits and free jumping attitude are very discussed among Authors and results are very different in accordance to breed and gender, mainly due to the fact that scores are defined in a subjective way (11).

Conclusions

All trials showed a natural inclination to training of the horses and fast improving of all scores, demonstrating good suitability of the breed to saddle service and excellent predisposition to light draft.

Mares, trained for a shorter period comparing to stallions, obtained results quite similar to those of the males, showing therefore more docility and trainability. The real service horse, however, should be a gelding and the breeders should provide a constant production of these subjects, in order to satisfy the demand of a docile horse for sport and leisure.

“Gait elasticity and stride width” and “impulsion, willingness to go forward” scores result positively correlated with free jumping scores: this result even if not extendible to other breeds, in particular of warmblood horses, could anyway provide some information in the discussed field of sport horses evaluation.

Acknowledgements: Research supported by Regione Emilia Romagna

Part of this paper was presented at the EAAP Annual Meeting, Uppsala, Sweden, 2005

References

1. Catalano A.L., Martuzzi F. (1994) Diffusione, variabilità morfologica ed evoluzione della razza cavallina Bardigiana. *Annali Fac. Med. Vet. Parma*, Vol. XIV, pg. 121-132.
2. Catalano A.L., Conversi S., Martuzzi F., Sussi C. (2000) Il Cavallo Bardigiano. Le nuove prospettive di impiego. *Avvenire Agricolo*, 108, 2, pg. 9-13.
3. Catalano A. L., Martuzzi F., Filippini S., Vaccari Simonini F. (2005) Evaluation for riding and driving purposes of Bardigiano Horse stallions and mares. *Proc. Annual Meeting European Association for Animal Production*, LVI, Book of Abstracts n° 11, pg. 32.
4. Samoré A. B., Rosati A. (1995) Animal Model estimation of breeding values for Bardigiano horse breed. *Book of Abstract of the 46th Annual Meeting of the E.A.A.P.*, Prague, 1995.
5. Mantovani R., Pigozzi G., Cerchiaro I., Bailoni L. (2004) Results of genetic improvement in the Italian Heavy Draught Horse. *Proc. 6th Meeting New findings in equine practice*, 43-49.

6. Pagnacco G., Samoré A. B. (2003) Recent History and selection perspective in Italian Haflinger Horse. Proc. 5th Meeting New findings in equine practice, 9-23.
7. Fioretti M., Catalano A.L., Rosati A., Martuzzi F. (2005) Bardigiano Horse selection: a genetic global index for linear type traits. In: Conservation genetics of endangered horse breeds editors: Bodò I., Alderson L., Langlois B.. EAAP Scientific Series n°116, Wageningen Pers.
8. Fioretti M., Catalano A.L., Rosati A., Martuzzi F. (2003) A genetic global index for Bardigiano Horse selection. Proc. Annual Meeting European Association for Animal Production, LIV, pg. 422.
9. Luhers-Behnke H., Roehe R., Kalm E. (2002) New integrated breeding evaluation method used for German Warm-blooded horses. Acta Agraria Debrecenensis, 8, 1-4.
10. Catalano A.L., Martuzzi F., Summer A. (2001) Morpho-aptitudinal evaluation for saddle service of Bardigiano horse breed stallions. In: Recent Progress in Animal Production Science. 2 Proc. of the A.S.P.A. XIV Congress, pg. 641-643.
11. Koenen E.P.C., Aldridge L.I., Philipsson J. (2004) An overview of breeding objectives for warmblood sport horses. Livest. Production Science, 88, 77-84.

	Withers height ± SD	Max - Min	Hearth girth ± SD	Cannon bone girth ± SD	Shoulder length ± SD
Stallions	142.7083 ± 2.18	147 - 139	178.47 ± 5.40	19.54 ± 0.56	65.97 ± 2.12
Mares	139.6429 ± 2.64	144 - 135	174.11 ± 6.77	18.34 ± 0.62	63.05 ± 3.36

Table 1: body measures of Bardigiano stallions and mares

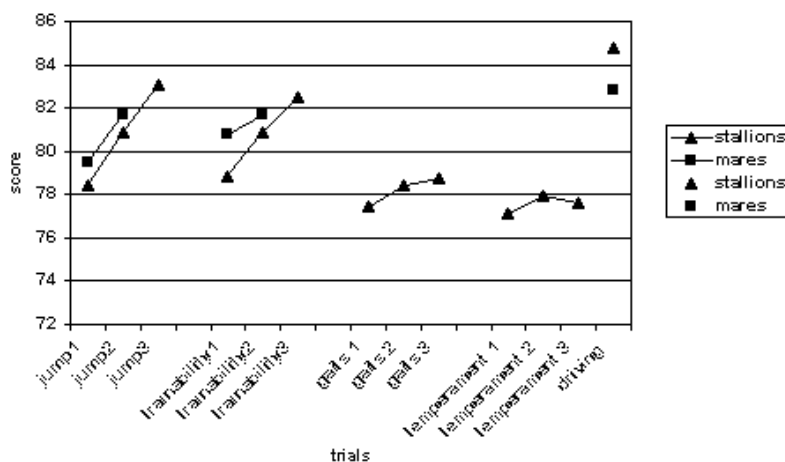


Figure 1: average scores for free jumping, trainability, gaits, temperament and driving for stallions and mares

	Gaits: confidence, easiness	Gaits: quality, balance	Gaits: elasticity, stride width	Free jumping
Withers height	- 0.148	- 0.171	- 0.024	- 0.213
Hearth girth	- 0.371*	- 0.211	- 0.226	- 0.141
Shoulder length	+ 0.973**	- 0.104	- 0.106	- 0.370*

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

Table 2: correlations between body measures and scores at the 3rd month's test of Bardigiano stallions

	Trainability	Free jumping	Driving
Gaits: confidence, easiness	+ 0.996**	+ 0.122	+ 0.432**
Gaits: quality, balance	+ 0.098	+ 0.236	+ 0.373*
Gaits: elasticity, stride width	- 0.275	+ 0.497**	+ 0.291
Temperament: impulsion, willingness to go forward	+ 0.010	+ 0.353*	+ 0.369*
Temperament: submissiveness	+ 0.118	+ 0.086	+ 0.364*
Temperament: attention, trust	+ 0.182	+ 0.165	+ 0.165

*: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$

Table 3: correlations between the scores of gaits and temperament and the scores of trainability, free jumping and driving at the 3rd month's test of Bardigiano stallions

A SURVEY ON GROWING FOALS FEEDING MANAGEMENT

INDAGINE SULLA GESTIONE ALIMENTARE DEL PULEDRO IN ACCRESCIMENTO

P. Superchi, A. Tognetti, A. Sabbioni, R. Smith, V. Beretti*

PAROLE CHIAVE:

cavallo, accrescimento, piani alimentari.

KEY WORDS:

horse, growth, feeding management.

Riassunto

L'indagine ha riguardato la gestione alimentare di tre allevamenti i cui puledri (n.74) sono stati destinati alla disciplina americana del reining oppure a gare di modello o di valutazione morfologica, con lo scopo di verificare la corrispondenza degli apporti alimentari forniti alle giumente a fine gestazione e lattazione e ai puledri fino ai due anni di età ai fabbisogni e di mettere in evidenza se eventuali eccessi o carenze alimentari si accompagnassero a patologie ossee da accrescimento. L'alimentazione delle giumente è risultata, in linea di massima, rispondente ai fabbisogni. L'incidenza di lesioni tipiche dell'accrescimento è stata più elevata nell'allevamento in cui i puledri hanno assunto, da 7 a 12 mesi di età, diete caratterizzate da un eccessivo apporto di sostanze azotate e di minerali, con particolare riferimento, allo zinco.

Summary

The trial concerned the study of the feeding management of three stud farms in which the foals were destined to the American discipline reining or bred for showing or morphological evaluation. The aim of the research was to examine the correspondence of nutrients intakes in mares at the end of their gestation and during lactation, and in foals up to two years of age, with animals requirements and then to point out if low or excessive feeding could be responsible for bone growth pathologies. Mares feeding met, in general, the requirements. The incidence of the typical lesions accompanying growth was higher in the stud farm where foals from 7 to 12 months of age assumed diets with excessive nitrogen and mineral content, with particular reference to zinc.

Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti
Facoltà di Medicina Veterinaria - Parma
Via del Taglio n° 8 - 43100 Parma - Tel. 0521/032618
paola.superchi@unipr.it

Introduction

The disturbances of locomotor apparatus in the horse during its growth can preclude its career and cause economic damage to the stud farm.

Amongst the factors that play a role in these pathologies, other than the quick growth, the genetic attitude and the excessive physical exercise, we find unbalanced diets that involve excess as much as the lack of one or more main nutritional elements (1).

When we talk about feeding in foals we have to consider that their growth is conditioned by the nutritional elements that they assume daily and by the influence of mares diets during the last third of pregnancy and during lactation.

Considering all of these factors, we wanted to examine some diets used in mares at the end of their gestation and during lactation, and in foals up to two years of age, with the purpose of verifying first of all the correspondence with animals requirements and then to point out if possible conditions of low or excessive feeding could be responsible for bone growth pathologies.

Material and methods

Three stud farms were taken into account, all in the province of Verona; horses were destined to the American discipline reining (stud farm A) or bred for showing or morphological evaluation in the category of “weanling” (stud farms B and C).

- Stud farm A

The group was composed of 40 Quarter Horse mares, ranging from 5 to 20 years old.

Between the last phase of gestation (8- 9 months) and the end of lactation, the mares were fed with a “dry diet”, consisting of hay and concentrate (specifically formulated for mares). The foals were suddenly weaned at six months of age and fed with hay and concentrate (containing different nutrients in relation to the production period of the foals) (table 1). Even if the animals were kept in paddocks all day long, they never had the possibility to assume significant quantities of fresh grass due to lack of fodder in the fields.

The daily ration of feed was divided in two meals, at 08.00 and at 17.00.

Table 1: Feeding management used in stud farm A.

	Mare in gestation (9-11 months)	Mare in lactation (1-3 months)	Mare in lactation (4-6 months) and foal	Foal (7-12 months)	Growing foal (13-24 months)
Concentrate kg “mare”	4	4	4		
Grass hay kg	10		12		

Alfa alfa hay kg (2° cut)		12		5	8
Concentrate kg “weaning”				2	
Concentrate kg “yearling”					4
Vitamin and kg trace elements integration				0.05	0.05

- Stud farms B and C

In both stud farms there were 20 mares, from different breeds such as Quarter Horse, Appaloosa and Paint Horse, ranging from 3 to 16 years old.

As in stud farm A, the fodder covering the paddocks was negligible so the mares and the foals couldn't take advantage of great quantities of fresh grass.

Regardless of the category of the animal the same concentrate was used according to the ration schemes in tables 2 and 3.

Foals were suddenly weaned at the age of 4-5 months.

In the stud farm B hay was given to the mares and the foals at the morning meal (08.00); the concentrate was supplied to the mare only at the evening meal (17.00), whereas foals were given concentrate at both meals.

Table 2: Feeding management used in stud farm B.

	Mare in gestation (9-11 months)	Mare in lactation (1-3 months)	Mare in lactation (4-6 months) and foal	Foal (7-12 months)	Growing foal (13-24 months)
Concentrate kg	4	5	8	7	8
Alfa alfa hay kg	10	10	10	2.5	6

In the stud farm C the ration schedule provided both mares and foals with hay during the morning meal (08.00) together with the supply of half of the total quantity of cereals; mineral, protein and vitamin premix were provided at 12.00, as the remaining part of cereals at 18.00.

Table 3: Feeding management used in stud farm C.

	Mare in gestation (9-11 months)	Mare in lactation (1-3 months)	Mare in lactation (4-6 months) and foal	Foal (7-12 months)	Growing foal (13-24 months)
Oats 34% + kg barley 33% + maize 33%	3	5	6	4	4

Premix	kg	1	1.5	1.5	1.5	1.5
Grass hay	kg	10	10	10	4	4

None of the stud farms herds used the technique of creep feeding for the foals.

Samples of each component of the rations were taken for proximate analysis (2) and phosphorus, calcium, copper and zinc contents with an atomic absorption spectrophotometer.

On the basis of these results the nutritive value was calculated and expressed in UFC (Horse Feed Units) and MADC (Horse Digestible Crude Protein) (3).

The daily intake of nutrients were compared to the requirements of the animals, as suggested by Martin-Rosset (4) and Martin-Rosset et al. (5).

Results and discussion

From the analysis of the daily nutrients intake in each herd, it's possible to make some considerations:

- Mares in Gestation (9-11 months)

As daily d.m. intake was similar (12.4 -13 kg) in the three stud farms (table 4), nutrient intake of UFC were in excess (20-30%) than requirements; the excess for MADC was highest for stud farm B (159%).

Table 4: Daily intake and percentage differences with requirements (within brackets).

	UFC	MADC g	Ca g	P g	Cu g	Zn g	Dry matter intake kg
Stud farm A <i>Requirements = 100</i>	7 (+21)	876 (+81)	101 (+159)	51 (+82)	87 (-27)	936 (+70)	12.4
Stud farm B <i>Requirements = 100</i>	6.8 (+19)	1260 (+159)	192 (+392)	51 (+82)	137 (+25)	856 (+56)	12.5
Stud farm C <i>Requirements = 100</i>	7.5 (+29)	1077 (+122)	107 (+174)	49 (+75)	184 (+67)	521 (-5)	13

Meyer (6) reports that food energy, influencing the production of hormones involved in the resumption of cyclic activity, assumes an important role in the reproductive activity, as it doesn't seem to be a determining factor in the growth of the foal.

It has actually been seen that over-fed mares in this phase encounter easier in the next oestrus cycle an embryonic reabsorption (7)

The supply of nitrogenous supplements in the last month of pregnancy would affect the development of the foal, at least for the first five weeks of life, but it doesn't influence the weight of the foal at birth (8).

The effects of an energetic and nitrogenous over feeding in this phase, even though nowadays more frequent than we expect, have been not well studied. It's possible that unbalanced diets can cause metabolic disorders (acidosis), with negative recoil on the absorption and utilization of nutrients, that in this way become less available for the embryo.

In the present study, the intake of calcium and phosphorus were higher than requirements of the horse, especially in stud farm B (392% for Ca); Ca/P ratio was about 2/1 in stud farms A and C while in stud farm B it was about 3/1.

The excess of calcium, in addition to a rise of the losses of phosphorus in the faeces, can reduce the absorption of magnesium, manganese and iron by means of insoluble salt formations or a competitive mechanism in the absorption sites (7). This could affect the vitality of the foals at birth and, like in other species, the formation of bones and the neuro-muscular transmission (9).

Better in line with the nutrient requirements of the horse are the results of copper and zinc; the most evident unbalances were found in stud farm A, in which a lack of copper (-21%) and an excess of zinc (70%) were found.

- Mares in lactation (1-3 months)

In this phase of the productive cycle, the rations (table 5) were quite balanced both under energetic and nitrogenous aspects. In the stud farms A and B a slight lack of UFC (-13%) and an excess of MADC (70-78%) were found.

Table 5: Daily intake and percentage differences with requirements (within brackets).

	UFC	MADC	Ca	P	Cu	Zn	Dry matter intake kg
		g	g	g	g	g	
Stud farm A <i>Requirements = 100</i>	8 (-13)	1307 (+70)	208 (+343)	50 (+25)	171 (+14)	876 (+17)	14.3
Stud farm B <i>Requirements = 100</i>	8 (-13)	1372 (+78)	203 (+332)	56 (+40)	144 (-4)	1015 (+35)	13.4
Stud farm C <i>Requirements = 100</i>	9.4 (+2)	1236 (+61)	108 (+130)	56 (+40)	196 (+31)	567 (-24)	14.5

The physiological needs of the mare in this period reach their highest levels and the nutritional contribution is not only capable of affecting the animals health but also their reproductive abilities, their weight, and the growth of foal throughout the milk production.

Jarrige and Martin-Rosset (10) refer that a moderate energetic undernourishment at the beginning of lactation (80% of requirements), reduces no more than 10% the daily increase of foal. In the instances of slight low feeding the mare uses her own lipid reserves to prevent a drastic drop of milk production.

With reference to the nitrogenous supply it has been observed that the addition of urea in diets for mares with low proteic value negatively affects the growth of the foal (11) and that the blood concentration of limiting aminoacids, such as lysine

and methionine, results higher in foals from mares receiving soybean meal as proteic source in the diets (7).

Among minerals and trace elements the most important variations involved the intake of calcium that in stud farms A and B exceeded by 300% the requirements, with possible negative repercussions on the production of the parathyroid hormone and consequently on the kidney synthesis of 1,25-(OH)₂-vitamin D and on the intestinal absorption of calcium.

Similarly to what happens in other species, also in the horse it has been studied that the absorption of calcium varies in the opposite way respect to the quantity taken daily (10).

At a daily intake of calcium of 27 g/kg d.m., near to that found in stud farms A and B, it has been observed a rise in the bone density and a decrease of the cortical zone of the long bones (7).

The Ca/P ratio was equal to 4.6/1, 3.6/1 and 1.9/1 for stud farms A, B and C, respectively.

With reference to the intake of copper and zinc, the highest variations interested the stud farm B (-4% for copper and +35% for zinc) and C (+31% for copper and -24% for zinc).

- Mares in lactation and foals (4-6 months)

Only with limits arriving from a complicated valuation of the nutritional principles made without taking count of how much milk is actually consumed by the foals or how much food does the mares consume, we can say that, the stud farms taken in consideration, do respect the nutritional needs in most ways (table 6).

Table 6: Daily intake and percentage differences with requirements (within brackets).

	UFC	MADC	Ca	P	Cu	Zn	Dry matter intake kg
		g	g	g	g	g	
Stud farm A <i>Requirements = 100</i>	8 (-33)	1300 (+9)	113 (+45)	56 (-10)	99 (-43)	996 (+14)	14
Stud farm B <i>Requirements = 100</i>	10 (-17)	1710 (+44)	234 (+200)	77 (+24)	164 (-6)	1492 (+71)	16
Stud farm C <i>Requirements = 100</i>	10 (-17)	1316 (+11)	109 (+40)	60 (-3)	202 (+15)	590 (-33)	15.5

The most significant changes in comparison to the actual needs were found in herd B and regard calcium and zinc values.

- Foals 7-12 months

In the stud farm A where the fodder/concentrates ratio was 71/29 a slight lack of energy (UFC -27%) was noted, while in stud farms B and C, where the same ratio was, respectively, 26/74 and 42/58, the UFC resulted higher than the needs by 9% (table 7). The intake of MADDC, always in excess, resulted higher in stud farm B

(102%) than in A and C.

Table 7: Daily intake and percentage differences with requirements (within brackets).

	UFC	MADC g	Ca g	P g	Cu g	Zn g	Dry matter intake kg
Stud farm A <i>Requirements = 100</i>	4 (-27)	629 (+28)	105 (+218)	24 (0)	175 (+109)	875 (+119)	6.2
Stud farm B <i>Requirements = 100</i>	6 (-17)	990 (+44)	111 (+200)	52 (+24)	75 (-6)	1168 (+71)	8
Stud farm C <i>Requirements = 100</i>	6 (+9)	881 (+80)	70 (+112)	40 (+67)	148 (+85)	432 (+8)	8.5

The highest Ca/P ratio (4.3/1) was found in stud farm A, even though the intake of phosphorous was adequate to the requirements.

Savage et al. (12) while operating on foals in growth observed that the inversion of the Ca/P ratio determined a higher possibility of osteochondrosis with regards to a diet in which an excess of calcium comes together with the correct of phosphorous.

In this instance Cooper (13), reported that the excess of phosphorous, reducing the dietary cation/anion difference (DCAD), can determine acidosis and, consequently, an increase in the plasmatic level of parathyroid hormone which stimulates the intestinal absorption of calcium that would compensate the loss of urine elements.

Excepting for stud farm B, where there was a lack of copper (-6%), the levels of this element and zinc resulted correct or in excess to requirements.

The competition between copper and zinc observed in man and in different farm animals, hasn't yet been completely ascertained in the horse.

Hoyt et al (14), observed that the consumption in the diet of zinc oxide in dosages between 73 and 580 mg/kg, didn't influence the absorption and retention of copper if the latter is present in quantities equal to 12 mg/kg. The lack of Zn increases the loss of copper in faeces and reduces by 10% the blood copper level.

- Foals (13 - 24 months)

As reported in table 8, in the stud farm B the fodder/concentrates ratio was 42/58 and the resulting level in UFC was particularly high (32%).

The MADC have overcome in every case the needs foreseen for this animal category; the most significant changes were found in stud farm B (183%).

The levels of calcium and phosphorous, always with high values, are translated in Ca/P ratios of 3.7/1 (stud farm A) of 2.1/1 (stud farm B) and 1.9/1 (stud farm C). The contents of zinc more responding to the needs were found in stud farm C.

Table 8: Daily intake and percentage differences with requirements (within brackets).

	UFC	MADC	Ca	P	Cu	Zn	Dry matter intake kg
	g	g	g	g	g	g	
Stud farm A <i>Requirements = 100</i>	7 (+3)	1025 (+109)	140 (+367)	38 (+90)	203 (+103)	859 (+72)	10.5
Stud farm B <i>Requirements = 100</i>	9 (+32)	1386 (+183)	174 (+480)	67 (+235)	120 (+20)	1404 (+181)	12.4
Stud farm C <i>Requirements = 100</i>	7 (+3)	970 (+98)	82 (+173)	44 (+120)	162 (+62)	496 (-1)	10.2

Some considerations can be formulated referring to the lack or excess of nutrients previously discussed with the appearance of bone pathologies in the three stud farms (table 9).

Above all, the onset of the lesions were found for the most part in the period following the weaning and this brings one to assume that the unbalanced feeding registered in the diets of the mares at the end of gestation and during lactation didn't influence, at least not directly, the appearance of the above mentioned pathologies.

Table 9: Number and type of lesions examined in the stud farms.

	Phyinitis	Osteochondrosis	Angular deformities
Stud farm A (foal born n. 37)	0	0	0
Stud farm B (foal born n. 19)	3	2	2
Stud farm C (foal born n. 18)	1	1	1

In stud farm A the lack of energy associated with a moderate excess of MADC, in the phase after weaning, contributed to reduce the incidences of lesions since it permitted the animals to express a slower growth rate compared to the other subjects from the stud farms B and C.

When the improvement of the growth and the body conditions become the first priority, we find protein excesses, that in our case have overcome the needs by 102% (stud farm B) and 80% (stud farm C).

The most lesions were found in stud farm B in which two foals were inflicted, one with lameness, and the other with rigidity; for both their sport career was lost.

A part calcium excess found in all three herds and not always accompanied by a correct phosphorous level, the highest unbalances were found in stud farm B, where the lack of copper was associated with an excess of zinc that was exceeded by 67% of the known dosage responsible for symptoms recognisable of developmental orthopedic illnesses (15).

Conclusions

The feeding management of mares at the end of gestation, representing a critical aspect of the herd for the reflects that it had on the initial growth of the young, hasn't given any particular information on which to discuss.

To prevent the appearance of orthopaedic illnesses in foals after the weaning it's correct to avoid the nutritional gap between the period that precedes and that follows the lactation. It's right that the foals should be able to assume a creep feed since a few months old, i.e. a food that not only integrates eventual lack in the mothers milk but it is also capable of stimulating enzymes and to make easier the consumption of heterogeneous foods in the subsequent period. That could prevent the onset of endocrine variations and, consequently, of such lesions.

Bibliografia

1. JEFFCOTT L.B. (1997) - Osteochondrosis in horses. *Equine practice*, 43, 64-71.
2. MARTILLOTTI F., ANTONGIOVANNI M., RIZZI L., SANTI E., BITTANTE G. (1987) Quaderni metodologici n.8, CNR-IPRA, Roma.
3. VERMOREL M., MARTIN - ROSSET W. (1997) Concepts, scientific bases, structures and validation of the French horse net energy system. *Livestock Production Science*, 47, 261-275.
4. MARTIN- ROSSET W. (1994) - Alimentazione del cavallo in crescita. In "L'alimentazione dei cavalli" Edizioni Agricole , Bologna, 81-99.
5. MARTIN- ROSSET W., VERMOREL M., DOREAU M., TISSERAND J.L., ANDRIEU J. (1994) - The French horse feed evaluation system and recommended allowances for energy and protein. *Liv. Prod. Sci.*, 40, 37-56.
6. MEYER H. (1998) - Einfluss der ernährung auf die fruchtbarkeit der stuten und die vitalität neugeborener fohlen. Übers. *Tierernährung*, 26, 65-86.
7. FRAPE D. (2004) *Equine Nutrition and Feeding*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 650.
8. DOREAU M., MORETTI C., MARTIN ROSSET W. (2000) - Effect of quality of hay given to mares around foaling on their voluntary intake and foal growth. *Annals of Zootechnology*, 27,291-302.
9. McDONALD P., EDWARDS R.A., GREENHALGH J.F.D. (1992) - *Nutrizione Animale, Tecniche Nuove* Ed., Milano, pp.530.
10. JARRIGE R., MARTIN-ROSSET W. (1993) - *Il cavallo. Riproduzione, selezione, alimentazione, sfruttamento*. Mason Ed., Milano, pp.680.
11. MARTIN R.G., McMENIMAN N.P., DOWSETT K.F. (1991) - Effects of a protein deficient diet and urea supplementation on lactating mares. *J. Repr. Fert.*, (suppl.44), 543-550.
12. SAVAGE C.J., MCCARTHY R.N., JEFFCOTT L.B. (1993) - Effects of dietary phosphorous and calcium on induction of dyschondroplasia in foals. *Equine Veterinary Journal (Suppl. 16)*, 80-83.
13. COOPER S.R., TOPLIFF D.R., FREEMAN D.W., BREAZILE J.E., GEI-

- SERT R.D. (1999) - Effect of dietary cation-anion difference on mineral balance in weanling horses. Proceedings of the 16th Equine Nutrition and Physiology Symposium. North Carolina State University, Raleigh, 2-5 june, 110-115.
14. HOYT J.K., POTTER G.D., GREENE L.W., ANDERSON J.G. Jr (1995) - Copper balance in miniature horses fed varying amounts of zinc. J. of Equine Veterinary Science, 15, 357-359.
15. LEWIS L. D. (1996) Alimentazione e allevamento del cavallo. Ed. EMSI, Roma, pp. 518.

DETERMINATION OF VITAMIN E LEVELS IN AGED CHEESES

Ubaldi A., Serventi P., Delbono G.

Introduction

Analytical methods to determine Vitamin E concentration in cheese are reported in few international references^{1,2,3,4}.

The described methods are quite different and complicated to realise. Moreover, some steps relating to the purifying of the matrix and to the extraction of the Vitamin E from the fat, can provoke a depletion of certain quantities of Vitamin E. Consequently, our experimental work was necessary in order to point out a simple, accurate and easy to perform analytical method.

On the basis of the method applied in our laboratory on wet matrices (plasma and milk^{5,6}) we employed and adapted the techniques previously stated, modifying and validating it for solid matrices, such as aged cheeses (Parmigiano-Reggiano).

The outcomes of this work is necessary in order to perform a further scientific program on Vitamin E, considered a so called no-nutritional ingredients.

These molecules have metabolic valence, for example a preventive action on deficiency states and give to the foods the new classification of “functional”, based on European food rules.

Materials and methods

Samples

The cheese utilized for the analysis bought on the commerce, was divided up in small parts and conserved at 4°C under vacuum until to analysis. The cheese studied was Parmigiano-Reggiano (parmesan cheese) 24 months old.

Equipment

- Vortex (Heidolph Reax Top)
- Thermostatic multiple water-bath equipped with round-bottom flask (100 ml) fitted with ground stopper, cooling columns and gas tube
- Separating funnels (100 ml)
- Volumetric flask (100 ml)
- Rotary Evaporator (Buchi 461)
- Centrifuge (ALC 4235 A)
- HPLC Shimadzu LC-10 AD

Dipartimento di Salute Animale. Università degli Studi di Parma
Prof. Antonio Ubaldi - Sezione di Diagnostica e Tossicologia Sperimentale
e-mail: antonio.ubaldi@unipr.it

- Detector UV-Vis Shimadzu SPD-6AV
- Recorder: Shimadzu C-R5A
- Column CS Spherisorb C 18, 250 mm ODS 10 μ
- Hamilton syringe (50 μ l)

Reagents

- Methyl alcohol for HPLC (J.T. Baker)
- Ethyl alcohol (Carlo Erba)
- Petroleum ether for HPLC (J.T. Baker)
- Sodium chloride (Merck)
- Vitamin C (Fluka)
- Potassium hydroxide solution (50%)
- DL- α -tocopherol (SUPELCO)
- Nitrogen gas

Standard solution and calibration curve

The standard solutions were made from a stock solution (1000 mg/l) obtained dissolving 100 mg of DL- α -tocopherol in 100 ml of methyl alcohol. Work solutions were obtained progressively diluting stock solution in methyl alcohol.

The calibration curve was obtained analyzing five times each eight solutions of known concentration of analyte comprised between 0.3 mg/kg and 10 mg/Kg.

Conditions of HPLC

- Column temperature: ambient
- Mobile phase: methyl alcohol
- Flow rate: 1 ml/min
- Wavelength : 294 nm
- Retention time: 5 minutes
- Injection volume: 20 μ l

Saponification

In a test tube 2 g of sample (advised minimal amount), opportunely broken into small pieces, was added with 0.3 g vitamin C and 5 ml of distilled water. The mixture was heated to 50 °C and shaken for 5 minutes. After, 10 ml of ethyl alcohol and a spat of NaCl were added. The mixture was vortexed for 10 minutes, added of 5 ml of KOH and placed in a water bath for 30 minutes to 70°C under nitrogen flow.

Extraction

After cooling, the content of the flask was rinsed two times with 5 ml of distilled water and subsequently with 30 ml of petroleum ether that was poured in the funnel. The funnel was closed and mixed several times. Aqueous phase was recovered in the previous flask, while ethereal phase was placed in to a flask. Extraction procedure was repeated two times with 30 ml of ether. Ethereal phases arranged were combined and transferred in the separating funnel, rinsed six times with 50 ml of water and recovered in a flask. The funnel was rinsed with 10 ml of ether recovered

in the flask. Then, the material was placed in evaporator to 45°C until dryness under partial vacuum (5 minutes). After cooling, residual was recovered with 5 ml of methyl alcohol and after agitation the residual dissolved was transferred in a test tube. The test tube was centrifuged to 4000 rpm for 5 minutes. The over floating is used for analysis sample.

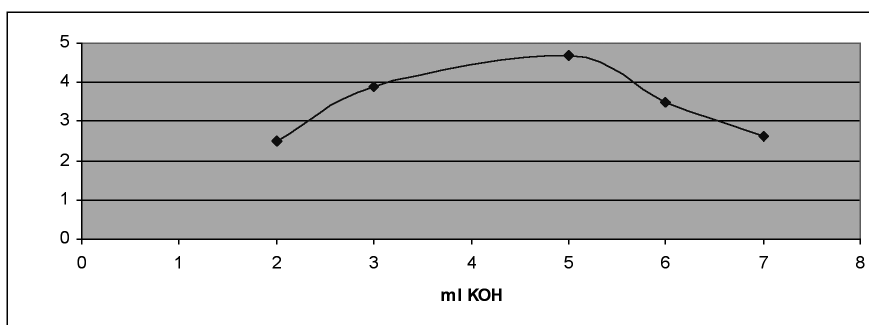
RESULTS AND DISCUSSION

The method of Ueda and Igarashi, opportunely modified was used for α -tocopherol separation from lipid component of cheese⁷. In Table 1 relationships between the amount of extracted vitamin E from the sample and volumes of KOH (1:1) are reported. The best extraction was recorded using 5 ml of KOH (solution) as showed in Figure 1.

Table 1: Relationship between volume of KOH and Vitamin E concentrations

KOH (ml)	Vitamin E (mg/kg)
2	2,5
3	3,9
5	4,7
6	3,5
7	2,6

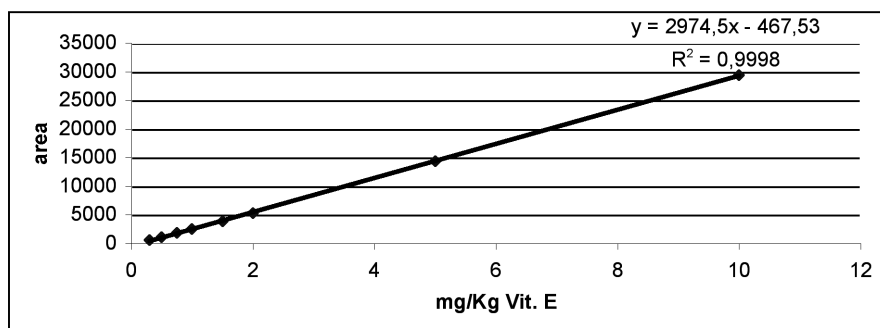
Figure 1: Graphic representation of relationship between volume of KOH and Vitamin E concentrations



The calibration curve was obtained by data reported in Table 2 and executed with standard solution increasing concentrations until to a value of 10 mg/Kg. The expression of the curve and value of $r = 0.999$ show the good linearity expressed from the analytical method under investigation. Calibration curve is represented in Figure 2.

Table 2: Analytical data obtained injecting Vitamin E standard utilized to plot calibration curve

	Vitamin E standard concentrations (mg/kg)							
	0,3	0,5	0,75	1	1,5	2	5	10
Area	660	1088	2052	2466	3849	5270	14426	29307
	888	1129	1780	2541	3743	5274	14223	28763
	506	1054	1708	2733	3908	5438	14382	29594
	412	1007	1800	2398	3950	5254	14400	29743
	n.d.	1029	1705	2557	3906	5182	14260	29368
Average	617	1061	1809	2539	3871	5284	14338	29355
St. dev.	208	48	142	126	80	94	91	374
CV %	33,7	4,6	7,9	4,9	2,1	1,8	0,6	1,3

Figure 2: Calibration curve

In Table 3 the values of average concentrations and standard deviation are reported, realized on none portions of the same cheese sample in order to verify repeatability intra-analysis. The data of the standard deviation allows calculating repeatability limit.

Table 3: Calculation of repeatability

Average conc. (mg/Kg)	3,746
St. dev.	0,201
Rep. limit = 2,8 x St. dev.	0,5628

The recovery tests were carried out on cheese samples. In four aliquots of the same cheese sample with known concentration (3,869 mg/Kg of Vitamin E), four sequential additions were made (5, 10, 20, 25, mg/kg) and for each sample double determination was carried out. The results, summarized in Table 4, show the average of recovery equal to 86,8 %.

Table 4: Recovery at different Vit E concentrations

Expetcted conc. (mg/kg)	Analyzed conc. (mg/kg)	Recovery %
8,913	7,88	88,4
13,913	11,88	85,4
23,913	20,387	85,3
28,913	25,498	88,1

To calculate the limit of quantification, the extractions obtained by four cheese samples at increasing dilutions were injected five time each. The data obtained are shown in Table 5.

Table 5: Limit of quantification

Sample	Expetcted conc. (mg/kg)	Analyzed conc. (mg/kg)	Difference %
A		3,932	
A/2	1,966	2,157	9,7%
A/3	1,311	1,559	18,9%
A/4	0,983	1,189	21,0%
A/5	0,786	1,213	54,3%

In Table 6 the data of two extractions (Samples A and B), measured at different times (1, 2, 7 days at 8°C) are reported. On the basis of the good CV values, we can state that the method has a good intermediate “day to day” repeatability.

Table 6: Intermediate repeatability test in purified samples

	A	A (1)	A (2)	A (7)
Average	4161	4038	3997	4334
St. Dev.	182	36	118	77
CV %	4,4	0,9	3,0	1,8
Conc. (mg/kg)	3,9	3,8	3,8	4,0
	B	B (1)	B (2)	B (7)
Average	4468	4636	4539	4742
St. Dev.	118	152	266	212
CV %	2,6	3,3	5,9	4,5
Conc. (mg/kg)	4,1	4,3	4,2	4,4

Sensibility is the measure of the magnitude of the response caused by a certain amount of analyte. In order to estimate the capability of the method to discriminate between small differences of concentrations, increasing amount of Vitamin E were added to the sample. The results are shown in Table 7 and in Table 8.

Table 7: Calculation of sensitivity

	A	A + 5%	A + 10%	A + 20%
Average	4208	4040	4402	4764
St. Dev.	132,6	110,0	351,2	166,2
CV %	3,2	2,7	8,0	3,5
Conc.	4,037	3,885	4,212	4,539
Expected		4,239	4,441	4,844
Difference		-8,35%	-5,16%	-4,72%

Table 8: Difference (%) between expected and determined concentrations

	Expected conc. (mg/kg)	Analyzed conc. (mg/kg)	Difference %
A		4,037	
A + 5%	4,239	3,885	-8,35
A + 10%	4,441	4,212	-5,16
A + 20%	4,844	4,539	-4,72

In Table 9 the values of t-Student test for the data scheduled in Table 8 are reported.

Table 9: t-Student calculated on the data reported in Table 8

Sample	p
A - A + 5%	0,0955
A - A + 10%	0,0152
A - A + 20%	0,0001
A + 10% - A + 20%	0,0440

Legend: p significant for < 0,05

A = reference sample;

A + 5% = sample with adding of 5% of vitamin E;

A + 10% = sample with adding of 10 % of vitamin E;

A + 20% = sample with adding of 20% of vitamin E.

The data recorded in Table 9 show significant differences. The comparison between the data obtained analyzing sample A respect to sample A added with 5% of Vitamin E (A+5%) shows that sample A+5% results lower than sample A. Therefore,

the p value is not significant owing to the inadequacy of the method to discriminate between very close concentrations lower or equal to 5%.

On the other hand, the significance p values found in correspondence of samples with higher added concentrations of Vitamin E underlines the good sensitivity of the method to discriminate among concentrations equal to or higher than 10%.

Conclusions

The described analytical method revealed characteristics of repeatability and stability necessary to be adopted by the laboratories that performs investigations on food matrices similar to our model.

Linearity, repeatability, accuracy, recovery, limit of quantitation and sensitivity were sufficiently good to draw the conclusion that the analytical method is applicable to determine Vitamin E concentration in the Parmigiano Reggiano aged cheese.

The method described will be employed in a research programme comprising the opportunity to increase the content of Vitamin E in dairy milk and in cheese by addition of Vitamin E to an innovative feed.

References

1. Cuvelier C., Doptrepe O., Istasse L. (2003) *Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamina E*. Ann. Mèd. Vet., 147, 315-324.
2. Bruschi L., Manzi P., Panfili G., Quattrucci E. (1992) *Aspetti metodologici della determinazione chimica di nuovi prodotti lattiero caseari: vitamine liposolubili*. Il Latte, dicembre, 1156-1157.
3. Panfili G., Manzi P., Pizzoferrato L. (1994) *High-performance Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Tocopherols, Carotenes, and Retinol and its Geometric Isomers in Italian Cheeses*. Analyst, June, 119, 1161-1165.
4. Stancher B. (1997) *Le vitamine liposolubili nei più comuni formaggi italiani a denominazione d'origine e tipici*. Industrie Alimentari. XXXVI, maggio, 621-626.
5. Ubaldi A., Serventi P., Delbono G., Renzi M. (2005) *Valutazione di un metodo rapido in HPLC per la determinazione di α -tocoferolo nel plasma di sangue*. Atti VII Conv. Naz. SIDILV, 7, 175.
6. Ubaldi A., Delbono G., Fusari A., Serventi P. (2005) *Quick HPLC method to determine vitamine E concentration in cow's milk*. Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma, Vol. XXV, 101-105.
7. Ueda T. and Igarashi O. (1990) *Determination of vitamin E in biological specimens and foods by HPLC. Pretreatment of samples and extraction of tocopherols*. J. Micronutr. Anal., 7, 76-96.

PROTEOLYSIS AND LIPOLYSIS OF PARMIGIANO-REGGIANO CHEESE AT DIFFERENT RIPENING PERIODS: 12, 24, 55 AND 96 MONTHS

PROTEOLISI E LIPOLISI DEL FORMAGGIO PARMIGIANO- REGGIANO IN DIFFERENTI PERIODI DI STAGIONATURA: 12, 24, 55 E 96 MESI

Massimo Malacarne, Paolo Formaggioni, Piero Franceschi, Andrea Summer, Primo Mariani

KEY WORDS:

Parmigiano-Reggiano cheese, ripening, proteolysis, lipolysis.

PAROLE CHIAVE:

Parmigiano-Reggiano, stagionatura, proteolisi, lipolisi.

Acknowledgements: the research was carried out in collaboration with the Consortium of Parmigiano-Reggiano cheese (Reggio Emilia).

Ringraziamenti: la ricerca è stata condotta in collaborazione con il Consorzio del Formaggio Parmigiano-Reggiano (Reggio Emilia).

Summary

A characterisation of the ripening phase of Parmigiano-Reggiano cheese has been reported in this note. The trend of physico-chemical characteristics and of indices descriptive of lipolytic and proteolytic processes of cheese have been illustrated. Data were obtained from 17 wheels of Parmigiano-Reggiano cheese of different age, ranging from the cheeses of 24-48 hours to cheeses of 8 years of ripening (96 months). Proteolysis and lipolysis trends showed distinctive peculiarities throughout ripening. Proteolysis resulted significant in the first 24 months of ripening, particularly in the first 6 months. Beyond two years the proportion of pH 4.6 soluble nitrogen remains unvaried. Lipolysis processes were characterised by a more regular trend: the proportion of free fatty acids (summation of FFA * 100 / cheese fat) increase till the 55th month of ripening. Afterwards, the values of FFA/cheese fat *ratio* was almost constant. Furthermore, a higher degree of lipolysis towards *medium* chain (C10÷C14) and, particularly, short chain (C4÷C8) fatty acids was observed.

Sezione di Scienze Zootecniche e Qualità delle Produzioni Animali,
Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti,
Università degli Studi di Parma, Via del Taglio 8, 43100 Parma, ITALY.
Phone +39 0521 032615; massimo.malacarne@unipr.it

Riassunto

In questa nota, la maturazione del Parmigiano-Reggiano viene illustrata attraverso l'esame dell'andamento di alcuni parametri chimico-fisici di base e di indici descrittivi dei processi proteolitici e lipolitici. I dati sono stati ricavati dall'analisi di 17 forme di Parmigiano-Reggiano a differenti epoche di stagionatura, a partire dall'estrazione dalla caldaia (0 mesi) fino a 96 mesi (8 anni di maturazione). Nel corso della stagionatura del Parmigiano-Reggiano, gli andamenti della proteolisi e quelli della lipolisi hanno mostrato peculiarità distintive. La proteolisi è risultata significativa nel corso dei primi 24 mesi di maturazione e, in modo particolare, nei primi 12 mesi. Dopo i due anni di stagionatura, il grado di solubilizzazione della caseina si arresta e, di conseguenza, la percentuale di azoto solubile a pH 4,6 tende a mantenersi costante. Il processo di lipolisi ha mostrato invece un andamento più regolare: la percentuale di acidi grassi che si liberano (sommatoria $AGL * 100 / \text{grasso del formaggio}$) aumenta in maniera continua fino a 55 mesi; successivamente questo valore tende a stabilizzarsi. Nel corso della maturazione, inoltre, si è potuta evidenziare una maggiore lipolisi a carico degli acidi grassi a corta catena (C4÷C8), una lipolisi intermedia per quelli a media catena (C10÷C14) ed una minore per gli acidi grassi a lunga catena (C16÷C18).

Introduction

The ripening of cheese is a complex *phenomenon*, a concatenation of physico-chemical, biochemical and biologic events strictly connected among themselves. During ripening, the curd, characterised by light taste and flavour, undergoes deeper changes until it assumes the typical rheological and sensory characteristics of the final product. The whole process of ripening consists essentially in an enzymatic "digestion" of the curd. The substrate is represented by the casein, but the process involves also the soluble components (sugar, lactic acid, citric acid, *etc.*) and, according to cheese variety, lipids. The physico-chemical and biochemical modifications evolve according to the characteristics of the substrate and to the nature of the numerous agents responsible for the transformation, and in relation to a great variety of primary and secondary products that originate throughout ripening, to their interaction and synergism. Essentially, these deeper changes consist in the loss of moisture, the fermentation of lactose, the partial metabolisation of the lactic acid and the citric acid, the more or less intense solubilisation of the casein and intermediate products, the hydrolysis of fat and the formation of the cheese rind. The main agents responsible for transformation (glycolysis, proteolysis, lipolysis) are represented by the milk enzymes, the starter, rennet preparation or substitutive, polluting microflora, secondary starter cultures used in specific dairy productions. The determinism of biotransformations is under the influence of several physico-chemical conditions which are able to influence the growth of microorganisms (bacteria, yeasts, mould), their capability to synthesize enzymes and, finally, the enzymatic activity: pH, water activity, redox potential, composition of the soluble phase, temperature, *etc.* The physico-chemical structure of the curd, of the cheese mass, exert a primary role with reference to the

state and degree of dispersion of bounded water, properties of the casein *reticulum*, structure of the paracasein, physical state of fat, size of fat globules and degree of integrity of milk fat globules membrane, *etc.*

The ripening of Parmigiano-Reggiano cheese take a *minimum* period of 12 months, but, in most cases, it last until 24 months. This period represents the basic characterising element of the cheese, imparting its peculiar qualities. In fact, during this phase the cheese develops its typical flavour and aroma properties. This is related to the enzymatic activities present in the cheese which are related to the peculiarities of the cheesemaking process, such as the use of raw milk, the addition of natural whey starter culture and the use of calf rennet. The intensity and the specificity of the enzymatic action seems to be strictly conditioned by the cheesemaking technology. The higher cooking temperature and the dimension of the cheese are able to determine the formation of a temperature gradient, which decrease from the inner to outer side of the cheese mass, and which remains for about 24 hours after the extraction of the cheese mass from the vat. This temperature gradient affects the development of microbial populations and, consequently, of their connected enzymatic activities, with important repercussions on the evolution of glycolytic and proteolytic processes in the outer and in the inner zones of the cheese during ripening. On the various “external” factors that are able to affect the processes of cheese ripening, previous research has underlined the significant role exert by the season of production.

Nowadays, the main research concerning the ripening of Parmigiano-Reggiano cheese were focused on the commercial ripening product, *e.g.* 24 months. Conversely, scarce information on cheese ripened over a period longer than 24 months are reported.

In this note, the ripening of Parmigiano-Reggiano cheese will be illustrated by the examination of some physico-chemical parameters and of some indices descriptive of the proteolytic and the lipolytic processes. The data showed were obtained by analysis of 17 cheese wheels of different age, ranging from extraction from the vat (0 months) to 96 months (8 years of ripening).

Materials and methods

The research was carried out on 17 Parmigiano-Reggiano cheese wheels produced in 12 cheese factories distributed in the provinces of Parma, Reggio-Emilia, Modena and Mantova.

The cheese wheels were selected according to their age, to cover the whole ripening cycle of Parmigiano-Reggiano cheese. In particular, 4 cheese wheels (one sample for season of production) were selected for each of the following age of ripening: 1, 12 and 24 months. Furthermore, 2 cheeses of 24-48 hours (defined as cheese mass at extraction from the vat), 2 cheeses of 55 months and 1 cheese of 96 months were sampled. For each cheese, the agreement to structural standard requirements was verified. Cheese was sampled according to standard FIL-IDF methods [1].

On cheese samples the following analyses were performed: pH with potentiometer; moisture by drying the sample at 102°C [2]; fat according to Gerber method modified by Siegfeld [3]; sodium chloride by titration with AgNO₃ [4]; for total nitro-

gen determination the Kjeldahl method was used; nitrogen soluble at pH 4.6 (SN), 12% trichloroacetic acid-soluble nitrogen (TCASN) and 5% phosphotungstic acid-soluble nitrogen (PTASN) were separated using the procedure proposed by Gripon *et al.* [5] and determined by the Kjeldahl method; ammonia nitrogen (NNH_3) according to Savini [3]. From nitrogen fractions, the values relative to the components of high molecular weight (Peptones N = NS - TCASN) and peptides of low molecular weight (Peptides N = TCASN - PTASN - NNH_3) were obtained. Free fatty acids were determined according to De Jong and Bandings [6] by means of capillary gas chromatography.

The data collected were subject to univariate ANOVA (SPSS 14.1, Chicago, IL), considering as a fixed factor the effect of the age of cheese (6 levels: 0, 1, 12, 24, 55 and 96 months of ripening).

Results and discussion

Physico-chemical characteristics of Parmigiano-Reggiano cheeses of different age - 0 (corresponding to the extraction of the cheese mass from the vat), 1, 12, 24, 55 and 96 months of ripening - are reported in table 1.

Table 1:

Basic composition of Parmigiano-Reggiano cheese at different age of ripening. Mean value $\pm$ SD.

Tabella 1:

Composizione di base del formaggio Parmigiano-Reggiano a differente età di stagionatura. Media $\pm$ DS.

Months of ripening <i>Mesi di stagionatura</i>	0 ⁽¹⁾	1	12	24	55	96
No. of cheeses <i>N. di formaggi</i>	2	4	4	4	2	1
Moisture (g/100g) <i>Umidità</i>	39.30 $\pm$ 0.44	37.00 $\pm$ 0.49	33.25 $\pm$ 0.65	31.06 $\pm$ 0.67	26.40 $\pm$ 2.33	25.10
Dry matter (g/100g) <i>Sostanza secca</i>	60.70 $\pm$ 0.44	63.00 $\pm$ 0.49	66.77 $\pm$ 0.65	68.94 $\pm$ 0.67	73.60 $\pm$ 2.55	74.90
Fat (g/100g) <i>Grasso</i>	27.45 $\pm$ 0.21	27.30 $\pm$ 0.50	28.87 $\pm$ 0.69	30.49 $\pm$ 1.01	32.47 $\pm$ 3.00	28.43
Protein (g/100g) <i>Proteina</i>	29.50 $\pm$ 0.69	30.89 $\pm$ 0.61	31.47 $\pm$ 0.77	32.65 $\pm$ 0.96	34.66 $\pm$ 1.14	40.92
NaCl (g/100g)	0.04 $\pm$ 0.02	0.97 $\pm$ 0.19	1.36 $\pm$ 0.22	1.48 $\pm$ 0.32	1.64 $\pm$ 0.08	1.97
NaCl/Moisture (g/100g) <i>NaCl/Acqua</i>	0.10 $\pm$ 0.05	2.64 $\pm$ 0.52	4.11 $\pm$ 0.67	4.80 $\pm$ 1.12	6.26 $\pm$ 0.92	7.84
pH	n.d.	5.32 $\pm$ 0.02	5.36 $\pm$ 0.02	5.36 $\pm$ 0.05	5.22 $\pm$ 0.01	5.34

(1) Cheese mass extract from the vat (24-48 hours); *Massa caseosa estratta dalla caldaia (24-48 ore)*

n.d. not determined; *n.d. non determinato*

Moisture content of cheese decreased significantly from the extraction of the cheese mass from the vat (39.30 g/100g) to 96 months ripened cheese (25.10 g/100g). An accentuated decrease of cheese moisture was observed during the first 12 months of ripening; in this period the loss of 6.05 g/100g of moisture was registered ($P<0.05$), corresponding to 43% of the whole cheese moisture variation from 0 to 96 months of age. In the following 12 months of ripening the loss of moisture resulted less accentuated and corresponded to 2.19 g/100g (15% of 0-96 months variation; $P<0.05$). From the cheeses of 24 months to those of 55 months, the moisture value recorded a further drop ($P<0.05$), corresponding to 4.66 g/100g (33% of the whole variation). No significant differences ($P>0.05$) of cheese moisture were observed between 55 months ripened cheeses and 96 months ripened cheese.

In general, the content of cheese protein and fat has underlined an increasing trend as the age of cheese increased. This trend has to be related to the corresponding variations of cheese moisture. The protein content is varied between 29.50 g/100g as observed in the cheese mass after the extraction from the vat to 40.92 g/100g reported for the 96 months ripened cheese ($P<0.05$). Concerning the cheese fat, the increase of its content with cheese age was observed until 55 months of ripening ($P<0.05$). On the other hand, the 96 months ripened cheese (data obtained from a single cheese sample) showed a fat value (28.43 g/100g) clearly lower than that observed in 55 months ripened cheeses ($P<0.05$) but no different ($P>0.05$) with respect to 0-1-12 and 24 months ripened cheeses (27.24-27.30-28.87 and 30.49 g/100g).

The content of sodium chloride (NaCl) is reported both on 100 g of cheese and on 100 g of cheese moisture. This latter value represents an indication of the saltiness of the aqueous phase in which cheese enzymes are present. These enzymes are involved in the chemical and biochemical reactions that are the basis of cheese ripening. The content of NaCl on 100 g of cheese moisture is markedly increased ($P<0.05$) from the extraction of the cheese mass from the vat (0.10 g/100g) to one month ripened cheese (2.64 g/100g), in correspondence with the end of the brining phase. Even if less accentuated, a clear increase of salt to cheese moisture was observed as cheese age increased: in 12, 24, 55 and 96 months ripened cheeses, it reached values, respectively, of 4.11-4.80-6.26 and 7.84 g/100g of cheese moisture. This trend is related to the loss of moisture during the ripening of cheese.

The pH values of cheeses varied significantly according to cheese age ($P<0.05$). An increase of pH values was observed from 1 to 12 months ripened cheeses (5.32 vs 5.36). No differences ($P>0.05$) were registered between 12 and 24 months ripened cheeses. Then, after 55 months of ripening, the pH value of cheese (5.22) was clearly lower ($P<0.05$) than in 24 months ripened cheese. Ninety-six months ripened cheese showed a pH value (5.34) markedly higher ($P<0.05$) than 55 months ripened cheese. The increase of pH values in the firsts months of ripening was reported in other studies carried out on hard and semi-hard cheeses, such as Cheddar, Gouda and Gruyère, ranging from 5 to 6 months of age [7, 8]. According to McSweeney and Fox [9], pH tended to increase during ripening because of the formation of alkaline nitrogen compounds (*e.g.* ammonia) and the catabolism of lactic acid. Zapparoli and Dugoni [10], in a study carried out on 60 Parmigiano-Reggiano cheese wheels of different age, had reported a decrease of cheese pH after 9 months of ripening. They

concluded that this was probably due to the accumulation of free fatty acids during ripening. In our study, the decrease of cheese pH was observed after 24 months of ripening. Actually, as reported in the follows paragraphs, proteolysis, in general, and the production of ammonia, in particular, seems to stop after the 24th month of ripening, while the production of free fatty acids continue progressively until the 55th month of ripening.

Proteolysis

Proteolysis is a basilar *phenomenon*, which is able to characterise the whole ripening process of cheese [11-14]. The biochemical reactions of proteolysis, which, starting from the curd, deeply modify the casein *reticulum*, is determined by an enzymatic system composed of proteases of different origin: milk (plasmin), rennet (chymosin), milk natural microflora (proteases from mesophilic lactic bacteria) and whey starter bacteria (proteases from thermophilic lactic bacteria). The cheese proteolysis is based essentially on enzymatic processes and its evolution depend on the action and interaction of those factors which are able to influence the specific enzymatic activities that take place during the whole ripening, such as the moisture content of cheese, pH values, salt content, free fatty acids, temperature, *etc.* The degradation of protein does not proceed necessarily from high to low molecular weight substances. The first step concerns the break down of single caseins by endopeptidase with the formation of small units (peptides of elevated molecular weight) which are, however, insoluble at pH 4.6, as the undigested casein [15]. These peptides are the substrate of esopeptidase, carboxipeptidases and aminopeptidases leading to the formation of medium-low molecular weight peptides and free aminoacids, all entities soluble at pH 4.6 [16].

a) *Ripening index* - The ripening index is represented by the percentage of pH 4.6 soluble nitrogen on the total nitrogen of cheese. This index is descriptive of the proportion of casein which is progressively digested by proteolytic enzymes. The values of the ripening index of Parmigiano-Reggiano cheeses of different age - 0, 1, 12, 24, 55 and 96 months of ripening - are reported in table 2.

Table 2:

Ripening index and soluble nitrogen composition of Parmigiano-Reggiano cheese at different age of ripening. Mean value $\pm$ SD.

Tabella 2:

Coefficiente di maturazione e composizione dell'azoto solubile del formaggio Parmigiano-Reggiano a differente età di stagionatura. Media $\pm$ DS.

Months of ripening <i>Mesi di stagionatura</i>	0 ⁽¹⁾	1	12	24	55	96
No. of cheeses <i>N. di formaggi</i>	2	4	4	4	2	1
Ripening index ⁽²⁾ <i>Coefficiente di maturazione⁽²⁾</i>	5.10±0.18	9.16±1.34	26.47±2.50	33.22±0.61	33.55±1.65	35.90
pH 4.6 soluble nitrogen composition (%) <i>Composizione dell'azoto solubile a pH 4,6 (%)</i>						
Peptones N/SN <i>N peptoni/NS</i>	51.05±2.08	26.48±5.33	9.33±1.17	10.65±1.37	10.23±1.71	10.12
Peptides N/SN <i>N peptidi/NS</i>	21.67±9.85	22.34±2.75	14.91±5.87	17.34±4.09	15.66±3.21	18.80
AA N/SN <i>N aa/NS</i>	24.74±7.79	47.65±5.10	69.04±5.37	63.70±3.00	66.03±3.33	62.14
NH ₃ N/SN <i>N NH₃/SN</i>	2.54±0.03	3.53±0.70	6.72±1.26	8.30±1.00	8.07±1.60	8.94

SN = pH 4.6 soluble nitrogen; NS = Azoto solubile a pH 4,6

AA N = free amino acids nitrogen; N aa = azoto degli amminoacidi liberi

NH₃ N = ammonia nitrogen; N NH₃ = azoto ammoniacale

(1) Cheese mass extract from the vat (24-48 hours); *Massa caseosa estratta dalla caldaia (24-48 ore)*

(2) SN *100/Total nitrogen - NS *100/Azoto totale

At the extraction of the cheese mass from the vat, 5% of cheese casein was solubilised. The degree of casein solubilisation increased progressively with cheese age ($P<0.05$). The values of the ripening index were 9.16-26.47-33.22-33.55 and 35.90%, respectively, in 1-12-24-55 and 96 months ripened cheeses. The solubilisation of casein was particularly remarkable during the first period of ripening, *e.g.* from the extraction of the cheese mass from the vat to 12 month aged cheeses (+21.37 percentage unit, $P<0.05$). Then, from 12 to 24 months ripened cheeses, the degradation of casein resulted as reduced in intensity (+6.75 percentage unit; $P<0.05$). After 2 years of ripening (24 months) no significant variation ($P>0.05$) of the ripening index was observed. When compared to shorter ripening cheeses, ranging from some months to one year, such as Emmentaler, Gruyère, Sbrinz, *etc.*, Parmigiano-Reggiano cheese had showed an intense solubilisation of casein, comparable to that in Emmentaler cheese one, but lower than that reported for an Asiago cheese, a semi-hard cheese [17, 18].

b) *Composition of pH 4.6 soluble nitrogen* - The composition of pH 4.6 soluble nitrogen of Parmigiano-Reggiano cheeses of different age - 0, 1, 12, 24, 55 and 96 months of ripening - is reported in table 2.

The proportion of peptones - among soluble nitrogen fractions, the primary substrate of the proteolytic activity - was decreased throughout the first 12 months of ripening, from a value of 51.05% in the cheese mass, to a value of 9.33% in 12 months ripened cheese ($P<0.05$). No further variations ($P>0.05$) of the peptone pro-

portion were observed in 24, 55 and 96 months ripened cheeses.

On the contrary, the proportion of phosphotungstic acid (PTA) soluble nitrogen - which represent the free amino acids contents of cheese - showed a sudden increase in the first month of ripening ($P < 0.05$), from a value of 24.74% in the cheese mass extracted from the vat, to a value of 47.65% in one month ripened cheese. A further increase ($P < 0.05$) of PTA nitrogen proportion was recorded between 1 and 12 months ripened cheese (+21.39 percentage unit). No differences ($P > 0.05$) of PTA nitrogen proportion were registered among 12, 24, 55 and 96 months ripened cheeses. Actually, free amino acids are the final products of the proteolytic processes and, consequently, they accumulate during the ripening of cheese.

No significant variations of the peptide proportion was reported amongst cheese of different age (average value 18.34%; $P > 0.05$). Actually, peptides represents an intermediate product of the proteolytic process: they are produced from the break down of peptones and are hydrolysed to produce smaller peptides and free amino acids. Amino acids and peptides affect sensory, nutritional and biological function properties of cheese. They represent over the 4/5 of the whole soluble nitrogen of commercial ripened cheese (24 months).

The proportion of ammonia nitrogen was increased progressively during the first 12 months of ripening, from 2.54 to 6.72%, respectively, in 0 (cheese mass extraction from the vat) and 12 months ripened cheeses. No variations ($P > 0.05$) were observed among 12-24-55 and 96 months ripened cheeses (6.72-8.30-8.07 and 8.94%).

In conclusion, the ripening "cycle" of Parmigiano-Reggiano cheese is characterised by a relevant solubilisation of the casein, with deep modifications of the rheological properties of the cheese. This *phenomenon* concurs to define the peculiar organoleptic attributes of commercial ripened cheese (24 months). The proteolysis of casein - mainly due to natural milk enzymes [16] - was particularly accentuated during the first 6 months of ripening, whereas it decreased in intensity during the intermediate and, above all, final phases of ripening. Proteolytic degradation of intermediate substrate and production of free aminoacids, with the contribution of bacterial proteases [19], results earlier and just as intense. From the third month of ripening, in fact, most of cheese soluble nitrogen is represented by amino acids and smaller peptides. However, after a deep modification in the first phase of ripening, from the 6th month of ripening an equilibrium among peptones, peptides, amino acids in the soluble nitrogen of cheese was observed. Ammonia nitrogen is the final product of nitrogen catabolism and its content is increased progressively until the 24th month of ripening. After this period, no further variation of ammonia nitrogen were reported.

Lipolysis

The hydrolysis of lipids does not affect the rheological and textural properties of cheese. However, it plays a relevant role in the development of cheese flavour. This phenomenon is much more marked in blue and in soft cheeses, while it is considered of moderate entity in hard cheeses [15]. The biochemical agents responsible for lipolysis are essentially represented by lipases. Besides the lipoprotein lipase of milk (LPL, which is less active at pH below 6.5), lipases produced by several micro-

organisms, such as those from mould and micrococci [15], seem to play a key role in cheese lipolysis throughout the ripening process. LPL is denatured by the effect of milk pasteurisation (above 60°C). On the contrary, most of microorganism lipases are still active in milk pasteurised at 76°C [15]. The specificity of the lipolysis is strictly dependent on the cheesemaking technology [20]. Moreover, it may vary in intensity in relation to several factors, such as the enzyme concentration, temperature, water activity, salt content, *etc.* However, as opposed to proteolysis, lipolysis should not be inhibited significantly by the salt content of cheese. In general, lipolysis is influenced by storage conditions and by all those operations that interfere with cheese ripening [21]. During Parmigiano-Reggiano cheese ripening lipolytic enzymes, particularly those of bacterial origin [22], produce variable amounts of free fatty acids, which are subjected to oxidative degradation and form low molecular weight carbonilic compounds characterised by certain aromatic properties [23], particularly if derived from unsaturated fatty acids. Besides this, cheese fat, by means of direct and derived products of lipolysis contribute to the rheological properties and concur in the formation of organoleptic and flavour characteristics of cheese as well, either in medium and in long ripened cheeses; minor or not well defined should be their role in the formation of cheese taste. However, free fatty acids seems to exert a meaningful role in the definition taste in some cheeses like Gouda, Gruyère de Comté and Emmental.

a) *Lipolysis index* - The progress of lipolysis during Parmigiano-Reggiano cheese ripening was analysed considering the *ratio* between the content of free fatty acids and that of cheese fat (lipolysis index). The values of the lipolysis index of Parmigiano-Reggiano cheese of different age - 0, 1, 12, 24, 55 and 96 months of ripening - are reported in table 3.

Table 3:

Lipolysis index and free fatty acids composition of Parmigiano-Reggiano cheese at different age of ripening. Mean value $\pm$ SD.

Tabella 3:

Indice di lipolisi e composizione degli acidi grassi liberi del formaggio Parmigiano-Reggiano a differente età di stagionatura. Media $\pm$ DS.

Months of ripening <i>Mesi di stagionatura</i>	1	12	24	55	96
No. of cheeses <i>N. di formaggi</i>	4	4	4	2	1
Lipolysis index ⁽¹⁾ <i>Indice di lipolisi⁽¹⁾</i>	0.75 $\pm$ 0.20	2.35 $\pm$ 1.00	4.15 $\pm$ 0.99	7.84 $\pm$ 2.19	8.80
Free fatty acids composition (%) <i>Composizione degli acidi grassi liberi (%)</i>					
C4÷C8	1.58 $\pm$ 0.98	5.12 $\pm$ 2.00	6.01 $\pm$ 1.12	10.84 $\pm$ 4.13	14.83
C10÷C14	10.17 $\pm$ 1.44	13.29 $\pm$ 1.62	13.67 $\pm$ 1.85	18.22 $\pm$ 5.44	23.72
C16÷C18	88.25 $\pm$ 0.56	81.58 $\pm$ 3.02	80.31 $\pm$ 2.58	70.93 $\pm$ 9.58	61.44

(1) Free fatty acids content* 100/cheese fat; *Contenuto degli acidi grassi liberi*100/grasso del formaggio*

During the first two years of ripening, free fatty acids had represented a higher proportion of fat as cheese age increased ($P < 0.05$), reaching values of 0.75-2.35 and 4.15% in 1-12 and 24 month ripened cheese, respectively. Fifty-five months ripened cheese was characterised by a lipolytic index (7.84%) higher than the value observed in 24 months ripened cheese ($P < 0.05$). The value reported for 96 months ripened cheese was not different ($P > 0.05$) with respect to 55 months ripened cheese. Trends and values observed here agree with the results of previous studies [24]

b) *Free fatty acids composition* - The composition of free fatty acids of Parmigiano-Reggiano cheese of different age - 0, 1, 12, 24, 55 and 96 months of ripening - is reported in table 3.

Single free fatty acids were grouped according to their number of carbon atoms: short chain fatty acids, $C4 \div C8$, *medium* chain fatty acids $C10 \div C14$, long chain fatty acids $C16 \div C18$.

As cheese ripening progressed, a sensible increase in the proportion of short chain free fatty acids was observed ($P < 0.05$). In fact, the values observed in 1-12-24-55 and 96 months ripened cheeses were 1.58-5.12-6.01-10.84 and 14.84%, respectively.

Even the proportion of *medium* chain free fatty acids registered an increased with cheese age ($P < 0.05$). The values reported in 1-12-24-55 and 96 months ripened cheese were 10.17-13.29-13.67-18.22 and 23.72%, respectively.

Conclusion

The trends of the proteolytic and lipolytic showed distinctive peculiarities during Parmigiano-Reggiano cheese ripening.

The cheese proteolysis resulted significant in the first 24 months of ripening and, particularly, in the first 6 months. After 2 years of ripening, no more solubilisation of casein was observed, consequently, the proportion of 4.6 pH soluble nitrogen tends to be constant. From a qualitative point of view, amino acids and peptides represent about 4/5 of the soluble nitrogen of the commercial ripened cheese (24 months). Both fractions concur, in a significant measure at the determination of organoleptic, nutritional and biological properties of cheese.

On the other hand, cheese lipolysis was characterised by a more regular trend: the proportion of free fatty acid on cheese fat increased progressively until 55 months, then it tended to stabilise. A higher degree of lipolysis toward short fatty acids ($C4 \div C8$) than *medium* ($C10 \div C14$), and, particularly, than long chain fatty acids ($C16 \div C18$), was observed during ripening.

Differences observed between the trends of the two enzymatic processes are probably related to the different activity that the respective group of enzymes show in relation to physico-chemical variation of the cheese paste throughout ripening. In this concern, a main role is exert by the salt content of cheese. The activity of proteolytic enzymes, in fact, is negatively affected by the increase the salt concentration of the water.

Our results clearly showed that the cheese fat undergoes important modifications even after 24 months of ripening. This is an "objective" data that allows for a

differentiation of long ripened (>24 months) from commercial ripened ($\leq$ 24 months) cheeses from a chemical point of view.

Introduzione

La maturazione del formaggio è un fenomeno complesso, una concatenazione di eventi chimico-fisici, biochimici e biologici tra loro strettamente connessi. La cagliata, contraddistinta da gusto e aroma tenui, si trasforma più o meno rapidamente, ma in misura profonda, fino ad assumere l'aspetto esteriore tipico del formaggio, la cui pasta acquisisce peculiari e marcate proprietà reologiche, nonché sapore ed aroma tali da caratterizzare definitivamente e in modo riconoscibile il prodotto finale. L'intero processo di trasformazione si configura essenzialmente in una vera e propria "digestione" enzimatica della cagliata. La materia prima è rappresentata sostanzialmente dalla caseina, dal reticolo caseinico, ma il processo coinvolge anche le componenti solubili (zuccheri, acido lattico, acido citrico, *etc.*) e, a seconda dei casi, in misura più o meno importante, anche le sostanze lipidiche. Le modificazioni fisico-chimiche e biochimiche, molto articolate, si evolvono in rapporto alle caratteristiche del substrato ed alla natura dei molteplici agenti responsabili delle trasformazioni, nonché della grande varietà dei prodotti primari e secondari che via via si formano, delle loro interazioni e dei sinergismi. Tali profonde modificazioni sostanzialmente consistono nella perdita di umidità, nella fermentazione del lattosio, nella parziale metabolizzazione dell'acido lattico e dell'acido citrico, nella solubilizzazione più o meno intensa della caseina con degradazione più o meno spiccata dei prodotti intermedi, nella idrolisi parziale del grasso e nella formazione della crosta. Gli agenti principali delle trasformazioni (glicolisi, proteolisi, lipolisi) sono rappresentati dagli enzimi naturali del latte, dai batteri e relativi enzimi dello starter, dagli enzimi del caglio e sostitutivi, dagli enzimi della microflora inquinante e dagli enzimi di starter secondari eventualmente impiegati nelle specifiche produzioni casearie. Il determinismo delle biotrasformazioni è sotto l'influenza di numerose condizioni chimico-fisiche del mezzo e dell'ambiente, vale a dire di tutti quei fattori che di volta in volta sono in grado di influire sullo sviluppo dei microrganismi (batteri, lieviti, funghi), sulla loro capacità di produrre enzimi e sulla efficienza delle attività enzimatiche: pH, attività dell'acqua, potenziale di ossidoriduzione, composizione della fase solubile (sale), temperatura ambiente, *etc.* La struttura fisico-chimica della cagliata, della massa caseosa fresca, svolge un ruolo specifico di primaria importanza con riferimento a stato e grado di dispersione dell'acqua legata, proprietà del reticolo caseinico e delle micelle di paracaseina, stato fisico del grasso, dimensioni dei globuli e grado di integrità della membrana, *etc.*

La "maturazione" del Parmigiano-Reggiano, che deve durare un periodo minimo di almeno 12 mesi, ma che normalmente si protrae fino a 24 mesi, rappresenta l'elemento basilare che caratterizza questa DOP conferendole peculiari qualità di pregio. È nel corso di questa lunga maturazione, infatti, che il formaggio sviluppa gli aromi e i sapori tipici che lo contraddistinguono. Ciò in virtù dell'azione specifica delle attività enzimatiche presenti nel formaggio, la cui origine è legata anche alle peculiarità distintive della tecnologia di trasformazione, che prevede l'impiego di

latte crudo, l'aggiunta di sieroinnesto naturale e di caglio di vitello. L'intensità e la specificità dell'azione enzimatica appare fortemente condizionata dalla tecnologia di lavorazione. L'elevata temperatura di cottura e la grossa dimensione della forma, infatti, sono tali da determinare un gradiente di temperatura, decrescente dall'interno verso l'esterno della massa caseosa, gradiente che permane per circa 24 ore dopo l'estrazione della stessa dalla caldaia. Tale gradiente influisce sullo sviluppo delle specifiche popolazioni microbiche e delle connesse attività enzimatiche, con importanti ripercussioni sull'evoluzione dei processi glicolitici e proteolitici, nella zona interna ed esterna del formaggio, nel corso della stagionatura. Anche la lenta ma progressiva "diffusione" del sale, dall'esterno verso l'interno della forma, è in grado di condizionare l'attività dei processi enzimatici, in particolare quelli di natura proteolitica. Tra i fattori "esterni", che possono influenzare i processi di maturazione del formaggio, precedenti ricerche hanno messo in evidenza il ruolo significativo esercitato dalla stagione di produzione.

Ad oggi, le principali ricerche riguardanti la caratterizzazione chimico-fisica della maturazione del Parmigiano-Reggiano si sono interessate al prodotto di stagionatura commerciale, vale a dire di circa 24 mesi di età. Scarse sono, invece, le informazioni riguardanti il formaggio a più lunga stagionatura.

In questa nota, la maturazione del Parmigiano-Reggiano sarà descritta attraverso l'esame dell'andamento di alcuni parametri chimico-fisici di base e di indici specifici dei processi proteolitici e lipolitici. I dati illustrati sono stati ricavati dall'analisi di 17 forme di Parmigiano-Reggiano di differente età, a partire dall'estrazione dalla caldaia (0 mesi) fino a 96 mesi (8 anni di maturazione).

Materiali e metodi

La ricerca è stata condotta su 17 forme di Parmigiano-Reggiano prodotte presso 12 caseifici ubicati nelle provincie di Parma, Reggio Emilia, Modena e Mantova.

Le forme sono state prelevate in modo da rispecchiare le principali fasi dell'intero ciclo di stagionatura del formaggio, nonché differenti periodi stagionali di produzione. Precisamente sono state campionate 4 forme per ciascuna delle seguenti età di stagionatura: 1, 12 e 24 mesi. In aggiunta, sono state prelevate 2 forme di 24-48 ore di età, definite come massa caseosa all'estrazione dalla caldaia (0 mesi), 2 forme di 55 mesi di stagionatura ed una di 96 mesi di età. Per tutti i formaggi, al momento del prelievo, si è verificata la rispondenza dei requisiti strutturali. I campioni sono stati prelevati secondo le metodiche FIL-IDF [1].

Sul formaggio sono state effettuate le seguenti determinazioni: umidità mediante essiccazione in stufa a 102°C [2]; grasso secondo il metodo Gerber modificato da Siegfeld [3]; cloruro di sodio per titolazione con AgNO_3 [4]; azoto totale mediante il metodo Kjeldahl; separazione delle frazioni azotate secondo lo schema di frazionamento proposto da Gripon *et al.* [5]. Si sono così ottenuti i valori dell'azoto solubile a pH 4,6 (NS), dell'azoto solubile in acido tricloroacetico 12% (NTCA) e dell'azoto solubile in acido fosfotungstico (NPTA); azoto ammoniacale secondo Savini [3]. Dalle frazioni azotate ottenute come descritto si sono ricavati i valori relativi ai composti a più alto peso molecolare (N peptoni = NS - NTCA) e ai peptidi a

basso peso molecolare insolubili in acido fosfotungstico (N peptidi = NTCA - NPTA - N-NH_3). Acidi grassi liberi mediante gas cromatografia capillare secondo De Jong e Bandings [6].

I dati raccolti sono stati sottoposti ad ANOVA univariata, considerando come fattore fisso l'età del formaggio (6 livelli: 0, 1, 12, 24, 55 e 96 mesi di stagionatura).

Risultati e discussione

Caratteristiche chimico-fisiche

Nella tabella 1 sono mostrate le caratteristiche del Parmigiano-Reggiano a diverse età di stagionatura: 0 (corrispondente alla massa caseosa all'estrazione dalla caldaia), 1, 12, 24, 55 e 96 mesi.

Il contenuto di umidità del formaggio si riduce in maniera statisticamente significativa ($P < 0,05$) dall'estrazione della massa caseosa dalla caldaia (39,30 g/100g) fino a 96 mesi di età (25,10 g/100g). La diminuzione di umidità è risultata particolarmente importante nel corso dei primi 12 mesi di stagionatura, periodo durante il quale è stato osservato un calo di 6,05 g/100g, corrispondente al 43% della variazione complessiva di umidità del formaggio osservata dall'estrazione dalla caldaia ai 96 mesi di età. Nei seguenti 12 mesi il calo di umidità del formaggio è risultato decisamente meno accentuato, pari a 2,19 g/100g (15% della variazione complessiva; $P < 0,05$). Dal formaggio di 24 mesi di età a quello di 55 mesi di età, il valore di umidità ha fatto registrare un ulteriore calo ($P < 0,05$), corrispondente a 4,66 g/100g (33% della variazione complessiva). Le variazioni di umidità tra i formaggi di 55 mesi e quello di 96 mesi sono risultate statisticamente non significative ($P > 0,05$).

In generale, i valori di grasso e di proteina del formaggio hanno evidenziato un tendenziale aumento con l'aumentare dell'età di stagionatura del formaggio, andamento da porre in stretta relazione con la diminuzione del contenuto di umidità. Il contenuto di proteina è risultato variare tra i 29,50 g/100g registrati nella massa caseosa all'estrazione, e i 40,92 g/100g osservati nel formaggio di 96 mesi di stagionatura ($P < 0,05$). Per quanto riguarda il grasso, il tendenziale incremento dei valori con il procedere della stagionatura è stato osservato dalla massa caseosa all'estrazione dalla caldaia (27,45 g/100g) fino ai formaggi di 55 mesi di età (32,47 g/100g); il formaggio di 96 mesi di età (dato relativo ad una sola forma) ha mostrato, invece, un valore di grasso (28,43 g/100g) più basso rispetto a quello rilevato per i formaggi di 55 mesi di età, ma statisticamente non diverso rispetto ai valori osservati nei formaggi di 0-1-12 e 24 mesi di stagionatura (27,45-27,30-28,87 e 30,49 g/100g).

Il contenuto di cloruro di sodio del formaggio viene riportato sia sul tal quale (in rapporto a 100g di formaggio), che in relazione a 100 parti di acqua del formaggio; quest'ultimo valore fornisce un'indicazione circa la salinità della fase acquosa nella quale si trovano gli enzimi coinvolti nei processi chimici e biochimici, responsabili della maturazione del formaggio. Il contenuto di NaCl riferito a 100 parti di acqua del formaggio aumenta ($P < 0,05$) in maniera repentina nel passaggio dalla massa caseosa all'estrazione dalla caldaia (0,10 g/100g) al formaggio di un mese di età (2,64 g/100g), cioè poco dopo l'uscita dalla salamoia. All'aumentare dell'età del formaggio si osserva un incremento della concentrazione del sale nella fase acquosa,

fino a raggiungere valori di 4,11-4,80-6,26 e 7,84 g/100g di acqua del formaggio, rispettivamente, a 12, 24, 55 e 96 mesi di stagionatura. L'andamento osservato è legato alla perdita di umidità che il formaggio subisce nel corso della stagionatura.

Il valore pH del formaggio è variato significativamente con l'età del formaggio ($P < 0,05$). In particolare, è stato osservato un incremento del pH dal mese 1 (5,32) al mese 12 (5,36) di età di stagionatura del formaggio ($P < 0,05$). Tra il formaggio di 12 e quello 24 mesi di età, invece, non sono state osservate differenze statisticamente significative. Dopo i 55 mesi di stagionatura, il valore pH del formaggio (5,22) è risultato più basso ($P < 0,05$) di quello osservato nel formaggio di 24 mesi di età. Il formaggio di 96 mesi ha evidenziato un valore pH (5,34) significativamente più elevato ($P < 0,05$) rispetto a quello del formaggio di 55 mesi. L'incremento dei valori pH, nei primi mesi di stagionatura, è stato rilevato in alcuni studi condotti su formaggi a pasta dura e semi-dura, quali Cheddar, Gouda e Gruyère, di età compresa tra 5 e 6 mesi [7, 8]. Secondo McSweeney e Fox [9], nel corso della stagionatura, il pH tende ad aumentare per la formazione di composti azotati a carattere alcalino (e.g. ammoniaca) e/o per il catabolismo dell'acido lattico. Nella ricerca di Zapparoli e Dugoni [10], condotta su 60 forme di Parmigiano-Reggiano e 40 forme di Grana Padano di diversa età, i valori di pH, osservati nelle forme di età superiore a 9 mesi, tendono a diminuire con l'avanzamento della stagionatura. Nella presente ricerca, invece, il "calo" dei valori pH è stato osservato a partire dal 24° mese. Secondo le osservazioni di Zapparoli e Dugoni [10] il decremento di pH, rilevato a partire dal 10° mese, sarebbe verosimilmente legato all'aumento più che proporzionale degli acidi grassi liberi. In effetti, come sarà detto qui di seguito, la proteolisi, in generale, e la produzione di ammoniaca, in particolare, sembrano arrestarsi dopo il 24° mese di stagionatura; mentre la liberazione degli acidi grassi prosegue in maniera "costante" fino al 55° mese di stagionatura.

Proteolisi

La proteolisi rappresenta un fenomeno di basilare importanza, in grado di caratterizzare l'intero processo di maturazione del formaggio [11-14]. Il complesso biochimismo proteolitico, che a partire dalla cagliata interessa e modifica profondamente il reticolo caseinico, è governato da un sistema enzimatico (endoproteasi e esopeptidasi) costituito da entità in parte native o endogene (plasmina - proteasi alcalina) e in parte esogene (chimosina - proteasi acida), nonché da proteasi di origine batterica, sia esogene (da batteri lattici termofili - sieroinnesto), sia endogene (mesofili inquinanti), *etc.* che, in definitiva, coinvolge tutti gli enzimi specifici del latte e del caglio, nonché quelli della microflora naturale del sieroinnesto e della microflora inquinante del latte.

L'evolversi della proteolisi, legata a fenomeni di natura essenzialmente enzimatica, dipende in misura variabile e dinamica, da tutti quei fattori, propri del mezzo ed ambientali, che, presi singolarmente o tra loro interagenti, sono in grado di influenzare le specifiche attività biochimico-enzimatiche che via via si innescano nel corso dell'intero processo di maturazione del formaggio: umidità della pasta (attività dell'acqua), pH, contenuto di sale, acidi grassi insaturi liberi, temperatura, *etc.*

La degradazione della proteina non procede necessariamente in modo regolare dalle unità ad elevato peso molecolare alle sostanze di piccolo o piccolissimo peso molecolare. La prima tappa è rappresentata dalla degradazione delle singole caseine ad opera delle endopeptidasi (peptide-peptido-idrolasi o proteinasi) con formazione di unità più piccole ("peptidi" ad elevato peso molecolare), ma pur sempre insolubili a pH 4,6 al pari della caseina integra [15]. Su questi prodotti (albumose e proteosi) intervengono le esopeptidasi che determinano la formazione di peptidi a medio e basso peso molecolare (peptoni e peptidi p.d.), tutte entità solubili a pH 4,6 ivi compresi gli amminoacidi terminali che si liberano con il procedere delle attività (carbossipeptidasi e aminopeptidasi) proteolitiche [16].

a) *Coefficiente di maturazione* - Nella tabella 2 vengono mostrati i valori del coefficiente di maturazione del formaggio Parmigiano-Reggiano di differente età: 0, 1, 12, 24, 55 e 96 mesi di stagionatura. Tale indice è ricavato dal rapporto percentuale tra l'azoto solubile a pH 4,6 e l'azoto totale del formaggio. Si tratta di un parametro descrittivo della proporzione di caseina che viene progressivamente solubilizzata ad opera degli enzimi proteolitici.

Nel formaggio all'estrazione dalla caldaia risulta solubilizzata il 5% circa della caseina. Il grado di solubilizzazione della caseina aumenta ($P < 0,05$) in maniera progressiva con l'età. I valori dell'indice di maturazione osservati nei formaggi di 1-12-24-55 e 96 mesi sono risultati pari, rispettivamente, a 9,16-26,47-33,22-33,55 e 35,90%. La solubilizzazione della caseina è risultata particolarmente importante nel corso del primo periodo di stagionatura, vale a dire dall'estrazione della massa caseosa, al formaggio di 12 mesi (+21,37 unità percentuali; $P < 0,05$). Successivamente, dai 12 ai 24 mesi di stagionatura, il grado di solubilizzazione della caseina è risultato meno intenso (+6,75 unità percentuali; $P < 0,05$). Dopo due anni di stagionatura, le variazioni dell'indice di maturazione sono risultate statisticamente non significative.

Il Parmigiano-Reggiano, a paragone di altri formaggi, quali Emmental, Gruyère, Sbrinz, etc., - caratterizzati da tempi di stagionatura dell'ordine di alcuni mesi massimo 1 anno - manifesta una intensa solubilizzazione della caseina, comparabile a quella dell'Emmental, inferiore soltanto a quella di un non meglio precisato Asiago, a pasta semicotta al pari del formaggio Fontina [17, 18].

b) *Composizione azoto solubile a pH 4,6* - Nella tabella 2 viene riportata la composizione dell'azoto solubile a pH 4,6 del formaggio Parmigiano-Reggiano a diverse età: 0, 1, 12, 24, 55 e 96 mesi di stagionatura.

La proporzione dei peptoni, substrato primario dell'azione proteolitica nell'ambito delle frazioni dell'azoto solubile, diminuisce in maniera drastica nel corso dei primi 12 mesi di stagionatura, passando dal 51,05%, in corrispondenza dell'estrazione dalla caldaia, al 9,33% circa nel formaggio di 12 mesi di età ($P < 0,05$). Non sono state osservate variazioni statisticamente significative della percentuale di peptoni tra i formaggi di 24, 55 e 96 mesi di stagionatura.

Per contro, la proporzione di azoto solubile in acido fosfotungstico (azoto PTA) - frazione che rappresenta il contenuto di amminoacidi liberi - aumenta in maniera repentina nel primo mese, passando dal 24,74% all'estrazione dalla caldaia, fino al 47,65% nel formaggio di 1 mese. Un ulteriore incremento ($P < 0,05$) della percentuale di azoto PTA è stato registrato tra il formaggio di 1 mese e quelli di 12 mesi

di stagionatura (+21,39 unità percentuali). Le differenze della percentuale di azoto PTA tra i formaggi di 12, 24, 55 e 96 mesi di stagionatura sono risultate statisticamente non significative. Tale andamento è dovuto al fatto che gli amminoacidi liberi rappresentano il prodotto “finale” del processo proteolitico e, di conseguenza, tendono ad accumularsi nel corso della maturazione del formaggio.

La proporzione dei peptidi resta pressoché invariata per un lungo periodo e a 24 mesi di stagionatura si attesta su un valore pari al 17%. In effetti, i peptidi rappresentano un prodotto intermedio del processo di proteolisi, che si origina dalla degradazione dei peptoni e che, a sua volta, viene sottoposto ad ulteriore idrolisi per dare origine a piccoli peptidi e ad amminoacidi liberi.

Amminoacidi e peptidi, fattori che concorrono in misura importante alla determinazione delle proprietà organolettiche, nutrizionali e biologico-funzionali del formaggio, rappresentano oltre i 4/5 di tutto l'azoto solubile del prodotto a stagionatura commerciale (24 mesi).

La proporzione di azoto ammoniacale aumenta in maniera progressiva da 0 a 12 mesi, passando dal 2,54% al 6,72%, rispettivamente, nei formaggi di 0 e 12 mesi. Le variazioni della percentuale di azoto ammoniacale tra i formaggi di 12-24-55 e 96 mesi (6,72-8,30-8,07 e 8,94%) sono risultate statisticamente non significative.

In conclusione, il ciclo di maturazione del Parmigiano-Reggiano tende a caratterizzarsi per una rilevante solubilizzazione della caseina, con profonde modificazioni reologiche della pasta, fenomeni che concorrono in misura importante alla definizione delle peculiari caratteristiche organolettiche del formaggio stagionato. La proteolisi della caseina, principalmente ad opera degli enzimi naturali [16], risulta particolarmente intensa nel corso dei primi 12 mesi di stagionatura, mentre si attenua sensibilmente durante le fasi intermedie e soprattutto in quelle finali del ciclo di maturazione. Altrettanto precoce ed intensa risulta la degradazione proteolitica dei prodotti intermedi e la liberazione degli amminoacidi, con il concorso determinante delle proteasi batteriche [19], con “accumulo” rilevante di amminoacidi e di peptidi a basso peso molecolare che, insieme, già dopo il 1° mese rappresentano oltre la metà dell'azoto solubile totale. In ogni caso, la composizione della frazione solubile, dopo una profonda evoluzione iniziale, tende a stabilizzarsi, almeno a partire dal 12° mese, configurando una sorta di equilibrio tra peptoni, peptidi e amminoacidi liberi, mentre l'azoto ammoniacale, essendo l'anello terminale del catabolismo azotato, tende progressivamente ad aumentare, in misura moderata, fino alla fine del ciclo di stagionatura.

Lipolisi

L'idrolisi del grasso non determina importanti modificazioni a livello di consistenza e di proprietà reologiche del formaggio, ma gioca un ruolo di un certo rilievo nella formazione dell'aroma. Il fenomeno è molto più marcato nei formaggi a pasta blu (erborinati) e in quelli a pasta molle, mentre si ritiene sia di moderata entità nei formaggi a pasta dura [15]. Gli agenti della lipolisi sono rappresentati essenzialmente dalle lipasi (glicerol-estere-idrolasi). In aggiunta a quella naturale del latte (poco attiva a valori di pH inferiori a 6,5), nel formaggio sono molto attive le lipasi prodotte da

diversi microrganismi, principalmente quelle provenienti da muffe e da micrococchi [15]. La lipasi naturale del latte è soggetta a denaturazione anche per effetto di blandi trattamenti termici (sopra i 60°C); mentre gran parte delle lipasi di origine microbica sono piuttosto resistenti al calore, ancora attive nel latte pastorizzato a 76°C [15]. L'azione lipolitica - selettiva o meno a seconda della precipua attività enzimatica e della tipologia del formaggio [20] - può variare di intensità anche in rapporto a diversi fattori, quali concentrazione dell'enzima, pH, temperatura, attività dell'acqua, contenuto di sale, *etc.* In linea di massima, però, il sale non dovrebbe inibire la lipolisi in maniera significativa, al contrario di quanto si verifica per la proteolisi. Più in generale, la lipolisi risulta influenzata dalla durata di maturazione del formaggio, dalle modalità di conservazione e da tutte le operazioni che interferiscono con i processi di maturazione [21]. Nel corso della maturazione del Parmigiano-Reggiano gli enzimi lipolitici, soprattutto le lipasi di origine batterica [22], liberano quantità più o meno importanti di acidi grassi, dalla cui degradazione ossidativa si possono formare composti carbonilici a basso peso molecolare dotati anche di una certa valenza aromatica [23], specie se provenienti da acidi grassi insaturi. Nei formaggi a medio e a lungo periodo di stagionatura, il grasso, oltre che partecipare alla definizione delle proprietà reologiche della pasta, attraverso i prodotti diretti e derivati della lipolisi concorre anche alla formazione delle caratteristiche organolettiche, sicuramente dell'aroma; mentre minore o quanto meno non ben definita risulterebbe la sua partecipazione alla formazione del sapore. Tuttavia, in alcuni formaggi, quali Gouda, Gruyère de Comté ed Emmental, gli acidi grassi liberi sembrano in grado di svolgere un certo ruolo anche nella definizione del sapore.

a) *Acidi grassi liberi (AGL)* - L'andamento della lipolisi nel formaggio Parmigiano-Reggiano, vale a dire il processo di idrolisi dei trigliceridi che determina la liberazione degli acidi grassi, è stato valutato attraverso i valori del rapporto percentuale tra il contenuto totale degli acidi grassi liberi e il contenuto di grasso del formaggio (indice di lipolisi). Nella tabella 3 sono riportati i valori dell'indice di lipolisi del formaggio Parmigiano-Reggiano di differente età: 0, 1, 12, 24, 55 e 96 mesi di stagionatura. I dati evidenziano chiaramente che nel corso dei primi due anni di età gli acidi grassi liberi rappresentano una quota percentuale via via maggiore, registrando valori di 0,75-2,35 e 4,15%, rispettivamente, nei formaggi di 1-12 e 24 mesi di età. Nei mesi successivi il processo di lipolisi prosegue in maniera continua fino a 55 mesi di stagionatura, età in corrispondenza della quale il contenuto totale di acidi grassi liberi rappresenta il 7,84% del grasso; valore, questo ultimo, significativamente più elevato rispetto a quello osservato nel formaggio di 24 mesi, pari a 4,15%. Il valore della lipolisi osservato a 96 mesi, pari a 8,80% è risultato non differente, rispetto a quello di 55 mesi. Gli andamenti e i valori sono in accordo con quanto visto in precedenti ricerche [24].

b) *Composizione acidi grassi liberi* - Nella tabella 3 è riportata la composizione degli acidi grassi liberi del formaggio Parmigiano-Reggiano di 0-1-12-24-55 e 96 mesi di stagionatura. I singoli acidi grassi liberi sono stati raggruppati in base al numero di atomi di carbonio: acidi grassi a catena corta, frazioni da C4 a C8; acidi grassi a media catena, frazioni da C10 a C14; acidi grassi a lunga catena, da C16 a C18. Con il progredire della stagionatura è stato osservato un incremento significa-

tivo ($P < 0,05$) della percentuale degli acidi grassi liberi a catena corta, registrando valori di 1,58-5,12-6,01-10,84 e 14,83, rispettivamente, nei formaggi di 1-12-24-55 e 96 mesi di stagionatura. Anche la proporzione degli acidi grassi liberi a media catena è aumentata nel corso della stagionatura del formaggio ($P < 0,05$). I valori osservati nei formaggi di 1-12-24-55 e 96 mesi sono risultati pari, rispettivamente, a 10,17-13,29-13,67-18,22 e 23,72%.

Conclusioni

Nel corso della stagionatura del formaggio Parmigiano-Reggiano, gli andamenti della proteolisi e quelli della lipolisi, hanno mostrato peculiarità distintive.

La proteolisi risulta significativa nel corso dei primi 24 mesi di maturazione e, in modo particolare, nei primi 6 mesi. Dopo due anni di stagionatura, il grado di solubilizzazione della caseina si arresta e, di conseguenza, la percentuale di azoto solubile a pH 4,6 tende a mantenersi costante. Sotto il profilo qualitativo, la frazione solubile dell'azoto del Parmigiano-Reggiano, amminoacidi e peptidi, fattori che concorrono in misura importante alla determinazione delle proprietà organolettiche, nutrizionali e biologico-funzionali del formaggio, rappresenta oltre i 4/5 di tutto l'azoto solubile del prodotto stagionato.

Il processo di lipolisi mostra, invece, un andamento più regolare: la percentuale di acidi grassi che si liberano (AGL/grasso) aumenta in maniera continua fino a 55 mesi; successivamente questo valore tende a stabilizzarsi. Nel corso della maturazione si è potuto evidenziare un maggior grado di lipolisi a carico degli acidi grassi a catena corta ($C4 \div C8$), intermedio per quelli a media catena ($C10 \div C14$) e minore per gli acidi grassi a lunga catena ($C16 \div C18$).

Le differenze osservate circa gli andamenti dei due processi enzimatici sono, molto probabilmente, da mettere in relazione con la diversa attività che i rispettivi gruppi enzimatici mostrano in rapporto alle condizioni chimico-fisiche che si vengono ad instaurare nella pasta nel corso della maturazione del formaggio. Sotto questo profilo, un ruolo rilevante viene esercitato dal contenuto di sale del formaggio; l'attività degli enzimi proteolitici, infatti, si riduce in maniera sensibile all'aumentare della concentrazione salina dell'ambiente acquoso nel quale essi si trovano ad operare. Appare evidente, da quanto qui osservato, come il grasso del formaggio subisca importanti modificazioni oltre i 24 mesi di stagionatura. Ciò fornisce uno dato "oggettivo" che permette di differenziare, almeno sotto il profilo chimico, i formaggi "vecchi" e "stravecchi" rispetto a quelli a stagionatura commerciale.

References

1. Emmons D.B. (1999) Sampling and analysis. Practical Guide for control of cheese yield, s.i. 0001, 74-86. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
2. Norma internazionale FIL-IDF 4/A:1982 Fromages e fromages fondus - Détermination de l'extrait sec totale.
3. Savini E. (1946) Analisi del latte e dei latticini. Ed. Hoepli, Milano.

4. Norma internazionale FIL-IDF 88/A:1988 Fromages e fromages fondus - Détermination de la teneur en chlorures (méthode par titrage potentiométrique).
5. Gripon J.C., Desmazeaud M.J., Le Bars D., Bergère J.L. (1975) Étude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la présure commerciale. *Lait*, 55: 502-516.
6. De Jong C, Bandings HT (1990). Determination of free fatty acids in milk and cheese: procedure for extraction, clean up and capillary gas chromatographic analysis. *J. High Resolution Chromatography*, 13, 94-98.
7. Zerfiridis G.K., Vafopoulou-Mastrogiannaki A., Litopoulou-Tzanetaki E. (1994) Ripening changes of Gruyère cheese. *J Dairy Sci*, 67: 1397-1405.
8. Lawrence R.C., Creamer L.K., Gilles J. (1987) Texture development during cheese ripening. *J Dairy Sci*, 70: 1748-1760.
9. McSweeney P.L.H., Fox P.F. (1993) Cheese: methods of chemical analysis. In: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, Ed. Fox P.F., second edition, Vol 2, 341-388. Chapman & Hall, London, UK.
10. Zapparoli G.A., Dugoni F. (1997) Quadro analitico di acidi grassi valotati, pH ed umidità in formaggio Grana "scelto" da 1 a 20 mesi di stagionatura. *Sci Tecn Latt-Cas*, 48: 297-304.
11. Desmazeaud J.M., Gripon J.C. (1977) General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft*, 32: 731-734.
12. Péliissier J.-P. (1984) Protéolyse des caséines. *Sciences des aliments*, 4: 1-35.
13. Grappin R., Rank T.C., Olson N.F. (1985) Primary proteolysis of cheese proteins during ripening: a review. *J Dairy Sci*, 68: 531-540.
14. Fox P.F. (1989) Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J Dairy Sci*, 72: 1379-1400.
15. Alais C. (1984) *Scienza del latte*. Ed. Tecniche Nuove, Milano, Italy.
16. Addeo F., Moio L., Stingo C. (1988) Caratteri tipici della proteolisi nel formaggio Parmigiano-Reggiano: composizione della frazione caseinica. *Proceedings: Giornata studio composizione e caratteristiche del Parmigiano-Reggiano*, pp. 21-40. Ed. Consorzio Form. Parmigiano-Reggiano, Reggio Emilia, Italy.
17. Panari G., Mongardi M., Nanni M. (1988) Determinazione con metodi chimici delle frazioni azotate del Parmigiano-Reggiano. *Proceedings: Giornata studio composizione e caratteristiche Parmigiano-Reggiano*, pp. 85-95. Ed. Consorzio Form. Parmigiano-Reggiano, Reggio Emilia, Italy.
18. Bütikofer U., Rüegg M., Ardö Y. (1993) Determination of nitrogen fractions in cheese: evaluation of a collaborative study. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 26: 271-275.
19. Bottazzi V. (1993) I batteri lattici nella maturazione del formaggio Grana. *L'Industria del Latte*, 29(2): 73-88.
20. Benassi R. (1964) Sui processi lipolitici del formaggio. *Il Latte*, 38: 335-338.
21. Collins Y.F., McSweeney P.L.H., Wilkinson M.G. (2003) Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int Dairy*

- Journal, 13: 841-866.
22. Caboni M.F., Zannoni M., Lercker G. (1988) Lipolisi del grasso del Parmigiano-Reggiano. Proceedings: Giornata studio composizione e caratteristiche Parmigiano-Reggiano, pp. 113-121. Ed. Consorzio Form. Parmigiano-Reggiano, Reggio Emilia, Italy.
 23. Caserio G., Senesi E., Bianchi A., Renon P., Beretta G. (1972) Rapporti fra temperatura ed attività lipolitica di alcuni ceppi microbici isolati da formaggio Grana Padano. L'Industria del Latte, 8: 89-104.
 24. Sandri S., Fossa E., Pecorari M., Summer A., Mariani P. (1997) Osservazioni sull'andamento della lipolisi nel corso della maturazione del Parmigiano-Reggiano. Sci Tecn Latt-Cas, 48: 243-252.

GENOTYPIC AND PHENOTYPIC VIRULENCE FEATURES IN SALMONELLA ENTERICA STRAINS ISOLATED FROM MEAT

CARATTERISTICHE GENOTIPICHE E FENOTIPICHE DI PATOGENICITÀ IN STIPITI DI SALMONELLA ENTERICA, ISOLATI DA MATRICI CARNEE

Cristina Bacci*, Arianna Paris, Alessandra Salsi, Franco Brindani

PAROLE CHIAVE:

Salmonella enterica, PCR, patogenicità, profilo biochimico-enzimatico, fenotipo.

KEY WORDS:

Salmonella enterica, PCR, virulence, biochemical profile, phenotype.

Riassunto

Sono state individuate sequenze geniche cromosomiche (*invA* e *phoP*), plasmidiche (*spvC* e *spvR*) e valutate caratteristiche fenotipiche legate alla capacità infettante di 63 stipiti di *S. enterica*, isolati da matrici avicole e suine. I ceppi sono stati sottoposti a saggi biochimico-enzimatici per quantificare la velocità di idrolisi dei substrati ramnosio, O-nitrofenil- β -D-galattopiranoside (ONPG), mannitolo e citrato (Vitek®, bioMérieux). Il gene *invA* è stato rilevato in tutti gli stipiti, con l'esclusione di un ceppo di *S. Enteritidis*, mentre la sequenza genica *phoP* è stata riscontrata nell'82,5% dei campioni. Il frammento *spvR* è risultato presente in 20 stipiti, a differenza del gene *spvC*, apparso sempre assente, tranne in un ceppo di *S. Enteritidis*. Un'elevata percentuale di salmonelle (82,5%) ha metabolizzato il ramnosio, il mannitolo e il citrato. La maggioranza degli stipiti (74,6%) non ha idrolizzato l'ONPG. È stato determinato il tempo (ore) necessario affinché i ceppi raggiungessero il valore soglia arbitrariamente prefissato, ovvero una diminuzione di oltre il 50% della trasmittanza; limite ritenuto significativo per valutare l'intensità delle attività enzimatiche. Relativamente al citrato la maggior parte dei ceppi di *S. Enteritidis* (55%) ha superato tale valore entro 5 ore dall'inizio del test. Per il mannitolo, già nell'arco di 1 ora, la maggior parte degli stipiti ha raggiunto il limite soglia, indipendentemente dal serovar di appartenenza. La caratterizzazione fenotipica ha confermato che *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* possono essere considerati i sierotipi più patogeni, mentre *S. Derby*, *S. Anatum*, *S. London* e *S. Agona* i meno virulenti; tra questi due gruppi si può

Department of Animal Health, Section of Animal Origin Food Inspection, University of Parma.

*Corresponding author. Tel. 0521.902740

e-mail address: cristina.bacci@unipr.it

collocare *S. Virchow*, con una patogenicità intermedia.

Summary

Sixty-three *S. enterica* strains isolated from pork and poultry meat were searched for chromosomal (*invA* and *phoP*) and plasmidic (*spvC* and *spvR*) genes and for the phenotypes connected to their virulent attitude. The strains were subjected to biochemical essays, in order to evaluate their ability to hydrolize rhamnose, Ortho-nitrophenyl-galactopiranoside (ONPG), mannithol and citrate (Vitek®, bioMérieux). *InvA* gene was detected in all the strains but one *S. Enteritidis*, whereas *phoP* factor was detected in 82.5% of strains. Twenty strains carried *spvR* fragment: on the contrary, *spvC* gene was never detected, with the exception of one *S. Enteritidis*. An high percentage of salmonellae (82.5%) metabolized rhamnose, mannithol and citrate. The most part of the strains (74.6%) did not use ONPG. It was established to register the time (hours) required to observe a reduction of over 50% in the transmittance value for all the strains. This threshold was considered significative, in order to evaluate the intensity of the enzymatic activity. With regard to citrate, the most part of *S. Enteritidis* strains (55%). Exceeded this value within 5 hours from the beginning of the test. With regard to mannithol, the most part of the strains exceeded the threshold limit in just one hour, with no differences among the serovars. The phenotypic characterization confirmed that *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* can be considered the most virulent strains, while *S. Derby*, *S. Anatum*, *S. London* and *S. Agona*, the less virulent. *S. Virchow*, finally, showed an intermediate pathogenicity.

Introduction

Traditional and biomolecular methods are both employed in the qualitative and quantitative diagnostic identification of microorganisms contaminating foods. In addition, anyway, a genotypic and phenotypic characterization of the microorganism looks increasingly useful in order to evaluate its virulent attitude.

In order to better understand the mechanisms involved in the pathogenicity of various emerging or re-emerging bacterial strains, such as *Salmonella enterica*, it is essential to know the bacterial growing conditions, which can affect the phenotypic expression of virulence genes (6).

One of the main phenotypic factors supporting the virulence of *S. enterica* is the lipopolysaccharide (LPS), whose lenght and glycosilation ratio improve the serovars pathogenicity, because of the deriving steric hindrance. The chain elongation involves the bacterial enzyme α -mannosidase, catalyzing the addition of rhamnose (14).

Many salmonellae can produce one or several types of fimbriae, whose role is the strong attachment to the enterocytes, thus inducing the infection. For some serovars (including *S. Enteritidis*), the presence of mannose or mannithol induces a reduction in the synthesis of these adhesines. As the receptors for mannose are the same as those for lecithins, the presence of mannose contrasts the adhesion and the subsequent invasion of the host cells. Consequently, the enzymatic degradation of the monosaccharide enhances the virulence of strains owning mannose-sensitive

fimbriae (10).

Furthermore, the survival of the pathogen in host cells depends on the presence of siderophores, such as aerobactines: these molecules derive from the synthesis of two L-lysine with one citrate by aerobactin-synthase enzyme (4).

Virulence also depends on the presence and regulation of genotypic sequences located on both chromosomes and plasmides. *S. Typhimurium* genome was shown to include about 200 virulence genes; among these, *hilA* chromosomal gene, when expressed in the omonymous protein, is essential for the regulation of other genes, which are necessary for bacterial invasivity (*invF*, *sspC*, *orgA*), after specific environmental stimuli.

The phenotypic expression of *hilA* gene can be evaluated using an enzymatic assay using β -galactosidase bacterial enzyme. Ortho-nitrophenyl- β -D-galactopiranoside (ONPG) substratum is converted by the enzyme into galactose and ortho-nitrophenol, whose optic density is determined by a spectrophotometric analysis and is related, besides β -galactosidase activity, to the genic expression. Several authors proved that, after the addition of a carbon source (such as galactose or glucose) to the coltural medium, *hilA* phenotypic expression decreases. (3, 5, 11).

Another chromosomal sequence which is responsible of virulence is *inv* pathogenicity island and, particularly, *invA* gene, whose absence can lead to a lack of invasivity. Moreover, a region can exist that codifies for factors which are necessary for bacterial survival and multiplication in the host cell, and it is identified in the *phoP/phoQ* bicomponent regulatory system. This system is activated when *Salmonella* spp. enters the macrophages and it controls the expression of genes, some of which are involved in LPS modifications and in resistance towards some antimicrobial peptides, including cyclic lipopeptide polymixin B. This compound is frequently used as a bactericide towards Gram-negatives, which rarely show resistance towards it. It goes finally remembered that some *Salmonella* spp. serotypes, including *S. Cholerasuis*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. Pullorum* and *S. Typhimurium* frequently carry serovar-specific virulence plasmids, whose weight ranges from 30 to 60 MDa, containing an identical genic sequence, known as "*spv* region" (2, 4, 13). *Spv* region is composed by five genes: *spvRABCD*, among which *spvR* is the positive regulon and the remaining are structural genes, organized in an operon. The products of the operon seem to enhance bacterial multiplication in the host cell and its systemic spread, although the molecular mechanism is still unclear (1, 6, 7, 9).

The research points to evaluate the infectious potential of strains belonging to *S. enterica* species, isolated from swine and poultry stuffs, relating to their genotypic and phenotypic features. In this purpose, the isolates were searched for chromosomal (*invA* and *phoP*) and plasmidic (*spvC* and *spvR*) virulence factors by qualitative Polymerase Chain Reaction. The activity of some bacterial enzymes relating to the infectious potential of the strains, as the literature shows, was then quantified. The microorganisms were then searched for their ability to metabolize rhamnase, Ortho-nitrophenyl- β -D-galactopiranoside (ONPG), mannitol, citrate; they were then tested for resistance towards polymixin B. Finally, the relation between the presence of a specific virulence genotype and the intensity of the enzymatic activity towards these substrata was evaluated.

Materials and methods

34 poultry meat samples, with or without skin (chest, thighs, drumsticks without skin, steak and diced meat) and 35 pork samples (cotechino and sausages) were collected in different retail shops between Reggio Emilia and Parma provinces and analysed.

S. enterica strains, isolated according to Standard ISO 6579:2004 (8) were serologically identified, and then both genotyped and phenotyped. In this purpose, after over-night growth, the genome was extracted from every brothculture, by the use of a protocol providing for a chelating resin highly elective for metals (insta-Gene™ Matrix, BIORAD). The DNA obtained (1 µL diluted 1:10) was added with 24 µL Master Mix composed of 10X PCR Buffer (Applied Biosystem), 10 mM dNTPs (Eppendorf), 10 µM of every primer (Sigma Genosys), 5 U/µL Taq DNA Polymerase (Applied Biosystem) and, finally, 25 mM MgCl₂ (Applied Biosystem). The different genic virulence fragments were amplified by the following couples of primer: ST 139/ST 141 (*invA* gene, 284 bp), 337 L/338 R (*phoP* gene, 299 bp), *SpvC*, 891 bp (1, 12, 15). The amplification cycles were performed by a GeneAmp PCR System 2400 thermalcycler (Perkin Elmer).

Electrophoresis (100 Volt, 498 mA) was carried out on agarose gel 1,6% (Eppendorf), lasting 2 hours; the size of the amplicons was detected by the use of PCR 50 bp Low Ladder marker (Sigma Aldrich).

The strains were then identified by biochemical and enzymatic essays, using Vitek® instrument (bioMérieux); the system requires a GNI+ (Gram Negative Identification) card, made of 30 microtubes, containing 28 biochemical substrata, a negative control and a growth control. For every strain a bacterial inoculum (standard 1 of McFarland scale) was prepared. The enzymatic activity towards the different substrata was monitored for 12 hours by spectrophotometric analysis and it provided results expressed as a transmittance value. Finally, the decrease ratio of this value was calculated at 1-hour intervals since time 0, in order to establish a relation between transmittance and the intensity of the enzymatic activities expressed by the strains.

Results

Sixty-three strains belonging to *Salmonella enterica* species were isolated. Those deriving from poultry were serotyped as *S. Enteritidis* (14), *S. Virchow* (10), *S. Agona* (1), *S. Typhimurium* (1) while those from pork, as *S. Typhimurium* (19), *S. Derby* (8), *S. London* (4), *S. Anatum* (3), *S. Agona* (1), *S. Virchow* (1) and *S. Enteritidis* (1).

InvA gene was detected in all the strains, with the only exception of a *S. Enteritidis* strain, while the presence of *phoP* gene was detected in 52 strains (82.5%) (**Figure n. 1**). Twenty strains (31.7%) showed *SpvR* genic sequence; on the contrary, *spvC* gene was never detected, with the exception of one *S. Enteritidis* strain. Only one *S. Enteritidis* strain, isolated from poultry meat, lacks the four virulence genes, while one strain from pork, belonging to the same serovar, owns all the investigated genes.

The strains were then gathered into five groups of pathogenicity, basing on the number of detected genes (**Table n. 1**).

Most of the strains (82.5 %) metabolized rhamnose, mannithol and citrate; just one strain, belonging to *S. Virchow* serotype, did not use citrate. Furthermore, 74.6% of the strains did not use ONPG.

The transmittance reduction percentage (average value) compared to time 0 was then calculated, in order to examine the differences between the enzymatic activity of the strains. It was established to register the time (hours) required to observe a reduction of over 50% in the transmittance value for all the strains: this threshold was considered significative, in order to evaluate the intensity of the enzymatic activity. **Table n. 2** shows the biochemical-enzymatic profiles of the following strains: *S. Enteritidis* (group 1), *S. Typhimurium* (group 2), *S. Virchow* (group 3), *S. Derby* (group 4). Serovars *S. Agona*, *S. London* and *S. Anatum* were grouped together (group 5) because of the little number of isolates.

With regard to citrate, the most part of *S. Enteritidis* strains (55%) and the same percentage of group 5-strains exceeded the threshold within 5 hours since the beginning of the test. The 35% of the strains belonging to *S. Typhimurium* and the 38% of the strains belonging to *S. Derby* exceeded the limit within 6 hours. The 45% of group 3-strains (*S. Virchow*) required 5 hours, whereas the same percentage did not metabolize citrate (**Figure n. 2**).

With regard to mannithol, the most part of the strains (varying between 52% and 75%) reached the limit, with no differences among the serovars.

ONPG substratum was idrolyzed by only 11 strains, in times ranging from 2 to 8 hours (**Table n. 2**).

With regard to rhamnose, the threshold value was reached within 2 hours by the most part of the strains (ranging from 45% to 86%).

Three strains only (4.7%) belonging, respectively, to *S. Enteritidis*, *S. Virchow* and *S. Derby* serovars, were able to grow in presence of polymixin B.

Discussion

First of all, it should be stressed that *S. Enteritidis* serotype was predominant among poultry isolates (53.8%), while pork was mainly contaminated by *S. Typhimurium* (51.35%). With respect to virulence genes, all the strains but one (*S. Enteritidis*) owned *invA* gene, whose presence can be connected with host cells invasion. It is possible to state, therefore, that all the strains carrying that genic sequence, are provided with invasivity, at least potentially.

PhoP gene is widespread among *S. Enteritidis* (14/15), *S. Typhimurium* (18/20) and *S. Virchow* serotypes (11/11) which, therefore, could be less sensitive to the immune response carried out by the host macrophages.

The same genic sequence was detected in 46.7% of *S. Derby* strains (5/8), *S. London* (1/4) and *S. Anatum* (1/3). Although, in these strains plasmidic genes were not detected and this could lead to a lower virulence. Moreover, gene *spvR* was detected in 50% *S. Typhimurium* and 60% *S. Enteritidis* strains.

Consequently, the above mentioned serotypes seem more pathogen than the

others, with respect to the virulence genotype, although the proof should come from *in vivo* tests.

It is interesting to notice the genetic differences existing among strains of the same serovar, isolated from different foodstuffs: one strain from pork, in fact, carried all the searched genes, while one from poultry carried none of them.

Three *S. enterica* strains (*S. Enteritidis*, *S. Virchow*, *S. Derby*) showed resistance towards polymixin B. This phenotype can be related to the presence of *phoP* gene, which was detected in these serovars.

The evaluation of the metabolism of ONPG substratum by the strains belonging to *S. Derby* (50%), *S. Enteritidis* (20%) and *S. Virchow* (20%) serotypes allows to theorize a low phenotypic expression of *hilA* gene, connected with the infectious ability. On the contrary, a low percentage of *S. Typhimurium* strains (5%) metabolized the compound slowly, thus suggesting that the mentioned serovar is associated with an higher invasivity.

With regard to mannitol, every serovar was able to metabolize it rapidly; the threshold limit was exceeded within one hour from the beginning of the test. Besides, *S. Enteritidis* strains degraded the compound in longer times (2 hours); these strains show then an higher fimbriae sensitivity, in agreement with previous studies in the literature (4).

The kinetics of citrate metabolism indicate that 45% of *S. Virchow* strains did not degrade the substratum, suggesting that these strains are not able to produce aerobactines, which are necessary for the bacterial survival.

The fast degradation of rhamnose (within two hours) detected in *S. Virchow*, *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* hints that, concerning this phenotypic feature, the mentioned serovars are characterized by an higher virulence than the others.

Conclusions

The phenotypic study allowed to establish a relation between the speed of hydrolysis for four substrata and the serovar's potential infectious ability.

The phenotypic characterization of the strains confirmed that, among the tested serotypes, *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* can be considered the most virulent, while *S. Derby*, *S. Anatum*, *S. London* and *S. Agona*, the least, *S. Virchow* showing an intermediate virulence.

These results, which are in agreement with the results of the genotypic study, can be worrisome, considering that the most virulent serotypes are also the most frequently detected from humans and from foodstuffs.

Table 1: Pathogenicity classes of the different *Salmonella* spp. serovars, basing on the number of virulence genes.

Class	N. of strains
Class 1 (<i>invA</i> , <i>phoP</i> , <i>spvC</i> , <i>spvR</i>)	<i>S. Enteritidis</i> (1/15)
Class 2 (<i>invA</i> , <i>phoP</i> , <i>spvR</i>)	<i>S. Enteritidis</i> (8/15) <i>S. Typhimurium</i> (10/20) <i>S. Virchow</i> (1/11)
Class 3 (<i>invA</i> , <i>phoP</i>)	<i>S. Enteritidis</i> (5/15) <i>S. Typhimurium</i> (8/20) <i>S. Virchow</i> (10/11) <i>S. Derby</i> (5/8) <i>S. London</i> (1/4) <i>S. Anatum</i> (1/3) <i>S. Agona</i> (2/2)
Class 4 (<i>invA</i>)	<i>S. Typhimurium</i> (2/20) <i>S. Derby</i> (3/8) <i>S. London</i> (3/4) <i>S. Anatum</i> (2/3)
Class 5 (no virulence genes detected)	<i>S. Enteritidis</i> (1/15)

Table 2: Percentage of strains which exceeded the 50% threshold of transmittance reduction, for a specific substratum.

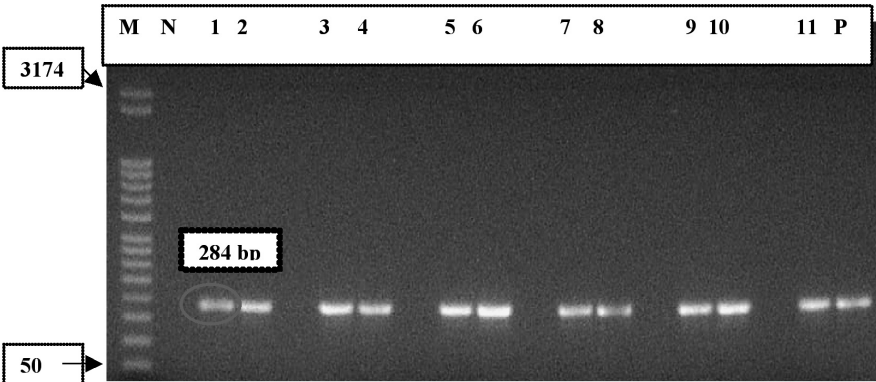
Group	Citrate					Mannithol		Onpg			Rhamnose			
1	4h	5h	7h	8h	12h	1h	2h	2h	7h	-	1h	2h	3h	
	9%	55%	37%	9%	9%	52%	48%	7%	13%	80%	7%	86%	7%	
2	4h	5h	6h	7h	8h	1h	2h	7h		-	1h	2h	3h	4h
	15%	35%	35%	10%	5%	60%	40%	5%		95%	15%	70%	10%	5%
3	5h	7h	-			1h	2h	2h	8h	-	1h	2h	3h	6h
	45%	10%	45%			64%	36%	9%	9%	82%	45%	18%	27%	10%
4	5h	6h	7h		12h	1h	2h	2h	7h	-	2h	3h	4h	
	38%	38%	12%		12%	75%	25%	12%	38%	50%	63%	25%	12%	
5	5h	6h	-			1h	2h	6h	-		1h	2h		
	55%	11%	34%			67%	33%	11%	89%		22%	78%		

Legenda:

- 1: *S. Enteritidis*
- 2: *S. Typhimurium*
- 3: *S. Virchow*
- 4: *S. Derby*
- 5: *S. Agona*, *S. London*, *S. Anatum*
- : substratum not metabolized

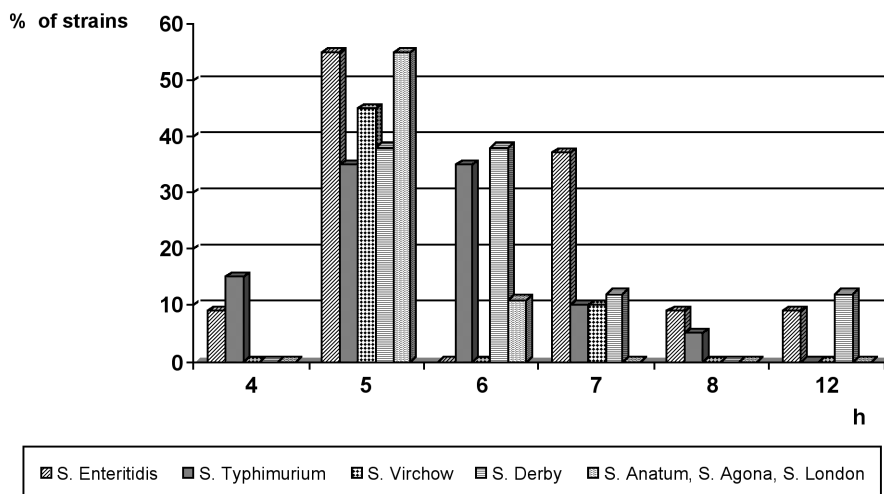
NB: The percentages in bold refer to the overcoming of the fixed value by the most number of the strains.

Figure 1: Electrophoretic run relating to the amplicon identifying *invA* gene.



Legenda:

- M= marker (PCR 50 bp Low Ladder, Sigma Aldrich)
- P= positive control
- N= negative control

Figure 2: Percentage of strains which exceeded the 50% threshold of transmittance reduction for citrate.

References

1. Abouzeed Y. M., Hariharan H., Poppe C., Kibenge F. S. B. (2000). Characterization of *Salmonella* isolates from beef cattle, broiler, chickens and human sources on Prince Edwards Island. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 23, (4), 253-266.
2. Bakshi C. S., Singh V. P., Malik M., Singh R. K., Sharma B. (2003). 55 kb Plasmid and virulence-associated genes are positively with *Salmonella* Enteritidis pathogenicity in mice and chickens. *Vet. Res. Comm.*, 27, 425-342.
3. Clements M., Eriksson S., Teczan-Merdol D., Hilton J., Rhen M. (2001). Virulence gene regulation in *Salmonella enterica*. *The Finnish Medical Society Duodecim, Ann. Med.*, 33, 178-185.
4. Cox J. (2000). *Salmonella*. *Enciclopedia of Food Microbiology*, Batt C. A., Patel P. D., Academic Press, 1928-1935.
5. Durant J. A., Corrier D. E., Stanker L. H., Ricke S. C. (2000). Expression of the *hilA* *Salmonella* Typhimurium gene in a poultry *Salmonella* Enteritidis isolate in response to lactate and nutrients. *J. of Appl. Microbiological.*, 89, 63-69.
6. Guiney D. G., Libby S., Fang F.C., Krause M., Fierer J. (1995). Growth-phase regulation of plasmid virulence genes in *Salmonella*. *Trends Microbiol.*, 3, (7), 275-279.
7. Gulig P., Danbara H., Guiney D. G., Lax A. J., Norel F., Rhen M. (1993). Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Molecular Microbiol.*, 7, (6), 825-830.
8. International standard UNI EN ISO 6579:2004. *Microbiology of food and*

- animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
9. Libby S. J., Adams L. G., Ficht T. A., Allen C., Whitford H. A., Buchmeter N. A., Bossie S., Guiney D. G. (1997). The *spv* genes on the *Salmonella* Dublin virulence plasmid are required for severe Enteritis and systemic infection in the natural host. *Infection and Immunity*, May 1997, 1786-1792.
 10. Mondo E. I. et al. (2001). *Sugars that Heal*. Ballantine Publishing.
 11. Nutt J. D., Woodward C. L., Kubena L.F., Nisbet D. J., Kwon Y. M., Ricke S. C. (2004). Potential for rapid *in vitro* assays to measure foodborne *Salmonella* virulence in foods - a review. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 12, 234-246.
 12. Rhan K., De Grandis S. A., Clarke R. C., Mc Ewen S. A., Galan J. E., Ginocchio C., Curtiss R. III, Gyles C. L. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular Cellular Probes*, (6), 271-279.
 13. Rondanelli M., Bionisio A., Giocosa A. (2005). Infezioni da *Salmonelle* in patologia umana. *Epidemiologia delle malattie a trasmissione alimentare in Italia e in Europa. Trattato sulle Infezioni e Tossinfezioni Alimentari*. Selecta Medica, 253-265.
 14. Sholz H. C., Arnold T., Marg H., Rosler U., Hensel A. (2001). Improvement of an *invA*-based PCR for the specific detection of *Salmonella* Typhimurium in organs of pigs. *Brel. Munch Tierartztl Wochenschr, salin pork* Sep-Oct 2001, 114, (9-10), 401-403.
 15. Tauxe R.V. (1997). Emerging Foodborne Diseases: an evolving health challenge. *Emerging Infectious Disease*, 3, (4), 425-432.

PRELIMINARY NOTES ON INVASION AND PROLIFERATION OF FOODBORNE *LISTERIA MONOCYTOGENES* STRAINS

Conter M.¹, Di Ciccio P.², D'Orio V.², Vergara A.², Zanardi E.¹, Ghidini S.¹, Ianieri A.¹

KEY WORDS:

Listeria monocytogenes; virulence; invasion and proliferation, HeLa cells.

Abstract

In this study, virulence properties of *L. monocytogenes* strains isolated from food and food environments were evaluated. In particular, adhesion and invasion efficiencies were tested in a cell culture model (HeLa). Half of the isolates (9/18) exhibited a high invasion index. In particular, the strain isolated from smoked salmon had the highest invasion index. The remaining isolates showed an intermediate invasion index. All environmental isolates belonged to this group. Finally, no isolates revealed a low invasion index. Regarding intracellular growth, all tested isolates had a replication time between 2 and 6 hours. For this reason, they can be considered virulent. In spite of its capability to invade HeLa cells with a medium/high invasion index, a non-haemolytic rabbit isolate did not show any intracellular growth. In conclusion, differences in invasion efficiency and intracellular growth did not seem strictly related to the origin of the strains. Moreover, invasiveness of an organism is not the only requirement for establishing an infection. Virulence of *L. monocytogenes* also depends on ability to grow intracellularly and to spread from cell to cell. For these reasons, PCR detection of known virulence genes has the potential to gain additional insight into their pathogenic potential. A comprehensive comparative virulence characterization of different *L. monocytogenes* strains in studies that include tissue culture models and PCR detection of virulence genes will be necessary to investigate differences in human-pathogenic potentials among the subtypes of this bacterium.

Introduction

Listeria monocytogenes is an ubiquitous bacterium that is responsible for food-borne illnesses in humans. It has been recovered in several countries and from many different foods of animal origin that have been linked to both sporadic cases and outbreaks of listeriosis (Thévenot *et al.*, 2006; Kiss *et al.*, 2006; Chao *et al.*, 2006). Disease incidence in humans is generally low, but given the severity of this illness and the high mortality rate (20-30%), in recent years great attention has been

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

² Dipartimento di Scienze degli Alimenti. Università degli Studi di Teramo

addressed to study the virulence properties of this microorganism (Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Jacquet *et al.*, 2002; Doumith *et al.*, 2004; Dussurget *et al.*, 2004).

Human population responses to exposures to *L. monocytogenes* are highly variable. Disease incidence is dependent on a variety of factors, including the presence of virulence factors, dose, and general health and immune status of the host (Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Dussurget *et al.*, 2004). Numerous methods have previously been applied to determine the virulence of this pathogen, including the use of either immunocompetent or immunocompromised animals, particularly mice (Stelma *et al.*, 1987; Roche *et al.*, 2001) or chick embryos (Terplan & Steinmeyer, 1989). However, maintaining sufficient numbers of mice or chick embryos for routine analysis is expensive and time-consuming. More recently, different reliable and reproducible cytotoxic tests based on continuous cell lines, such as Caco-2, Vero, Henle407, Hep-2 and HeLa cells, have been developed to distinguish between pathogenic and non-pathogenic *Listeria* spp. (Farber & Speirs, 1987; Pine *et al.*, 1991; Braun *et al.*, 1998; Van Langendonck *et al.*, 1998; Roche *et al.*, 2001; Larsen *et al.*, 2002).

The purpose of this study was to evaluate the virulence properties of *L. monocytogenes* strains isolated from food and food environments. Virulence was tested *in vitro* by the invasiveness and growth of the strains in HeLa cell lines.

Materials and methods

Bacterial strains and culture media. This study comprised 21 strains of *L. monocytogenes* (tab. 1). To perform the invasion assay, 3 control strains with different invasion index were used (Jaradat & Bhunia, 2003). Bacteria were grown overnight in brain heart infusion (BHI) broth (Oxoid, Milan, Italy) at 37°C. For the kinetics of the invasion assay, 1 ml of the overnight culture was used to inoculate 100 ml of fresh BHI broth (4 hours at 37°C under dynamic conditions) in order to obtain microorganisms at the end of the log-phase. At this point, the bacterial concentration was checked by using a spectrophotometer and the number of microorganisms was adjusted to obtain an optical density (OD) at 600 nm equal to 1.5, approximately corresponding to 10¹⁰ bacteria per ml.

To prepare inoculum for infection of cell cultures, 1 ml of the bacterial suspension was centrifuged for 10min at 4000 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus Sepatech, Germany) at 4°C, washed twice in sterile phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.3) (Sigma-Aldrich, Milan, Italy), resuspended in its original volume with the cryoprotecting agent (PBS with 20% glycerol) (Larsen *et al.*, 2002), and frozen at -80°C. For each experiment, the number of CFU was checked by plating the appropriate dilution on BHI agar.

Cell culture. The continuous cell line HeLa (carcinoma human cervix) was used. Cells were maintained by culture in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Cambrex Biosciences Italia) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Cambrex Biosciences Italia) 1% glutamine (Cambrex Biosciences Italia), and 1% non-essential amino acids (NEAA) (Cambrex Biosciences Italia). Confluent cell monolayers were trypsinized and adjusted to a concentration of 2.5 x 10⁵ cells ml⁻¹

in culture medium. One ml cell suspension was dispensed into each well of a 24 well tissue culture plate (Corning Costar) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air, for 24 hours, to obtain a semiconfluent monolayer.

Invasion assay and intracellular growth studies. The semiconfluent monolayers of HeLa cells were routinely inoculated with bacterial suspension adjusted to obtain a multiplicity of infection (MOI) of 100 bacteria per cell (100:1). After a brief centrifugation (3 min at 900 rpm) of the cell culture plate, binding and penetration was allowed to occur for 30 min. at 37°C in 5% CO₂, then cell monolayers were washed twice with PBS and covered with 1 ml of supplemented DMEM containing gentamicin at bactericidal concentration (1%) in order to kill extracellular bacteria (Gaillard *et al.*, 1987). After 1 hour, infected cells were washed twice with PBS and lysed with 100 µl of Triton X-100 and CFU of viable bacteria were counted by plating suitable dilution of the lysate on BHI agar incubated for 24 hours at 37°C. The invasion efficiency (Invasion Index, II) expressed as percentage of initial inoculum (T0) was calculated by dividing the number of CFU that invaded the cells (with gentamicin) by the total number of CFU inoculated (without gentamicin) (Jaradat & Bhunia, 2003). For intracellular growth studies, cells were lysed as described above 2, 4, and 6 hours (T2, T4, and T6) after gentamicin had been applied to the infected cells. The proliferation index (Index Growth Culture, IGC) was calculated dividing the number of CFU that invaded the cells at different incubation times (T2-T4-T6) without the initial inoculum (T0), by the initial inoculum (T0). Each isolate was measured in duplicate and results were expressed as mean value.

Results and conclusion

Figure 1 summarizes the results of the invasion assay. Half of the isolates (9/18) exhibited an invasion index higher than the reference strain ATCC 19115 (serotype 4b) described by Jaradat & Bhunia (2003) with a high invasiveness degree. In particular, the strain number 5, isolated from smoked salmon, had the highest invasion index, 17 times greater than the reference strain ATCC 19115. The remaining isolates showed an invasion index intermediate between reference strains ATCC 19115 (high invasiveness) and NCTC 11994 (medium invasiveness). All environmental isolates belonged to this group. Finally, no isolates revealed an invasion index lower than reference strains NCTC 11994 (medium invasiveness) or ATCC 19114 (serotype 4a) (low invasiveness).

Figure 2 displays the results from intracellular growth studies. All tested isolates had a replication time intermediate between 2 and 6 hours. For this reason, as described by Pine *et al.* (1991), they can be considered virulent. After internalisation, strains can be differentiated on the basis of their growth capacity, starting from the 4th hour after invasion (T4). In spite of its capability to invade HeLa cells with a medium/high invasion index, the non-haemolytic rabbit isolate did not show any intracellular growth, having a very low rate of recovery. In fact, it was previously shown that non-haemolytic *L. monocytogenes* mutants are internalized by cell cultures at the same rate as haemolytic strains, but afterwards they are almost completely unable to grow intracellularly (Gaillard *et al.*, 1987; Gattuso *et al.* 2000).

Differences in invasion efficiency and intracellular growth did not seem related to the origin of the strains, even if strains isolated from bread-coat chicken meat showed a similar behaviour. However, when interpreting the data, it must be taken into account that the study was conducted on a low number of strains.

In conclusion, invasiveness of an organism is not the only requirement for establishing an infection. Virulence of *L. monocytogenes* also depends on ability to grow intracellularly and to spread from cell to cell. For these reasons, PCR detection of known virulence genes has the potential to gain additional insight into their pathogenic potential. A comprehensive comparative virulence characterization of different *L. monocytogenes* strains in studies that include tissue culture models and PCR detection of virulence genes will be necessary to investigate differences in human-pathogenic potentials among the subtypes of this bacterium. Furthermore, a better understanding of the virulence characteristics of *L. monocytogenes* could prevent product recalls due to subtypes that do not present a public health risk.

Table 1: Bacterial strains.

Strain	Source
1	smoked salmon
2	smoked salmon
3	smoked salmon
4	smoked salmon
5	smoked salmon
6	smoked salmon
7	bread coat chicken meat
8	bread coat chicken meat
9	bread coat chicken meat
10	bread coat chicken meat
11	rabbit meat
12	pork fermented sausage
13	pork fermented sausage
14	pork fermented sausage
15	pork fermented sausage
16	smoked salmon environment
17	fermented sausage environment
18	chicken meat environment
ATCC 19114 (4a)	reference strain (ovine brain)
ATCC 19115 (4b)	reference strain (human)
NCTC 11994 (4b)	reference strain

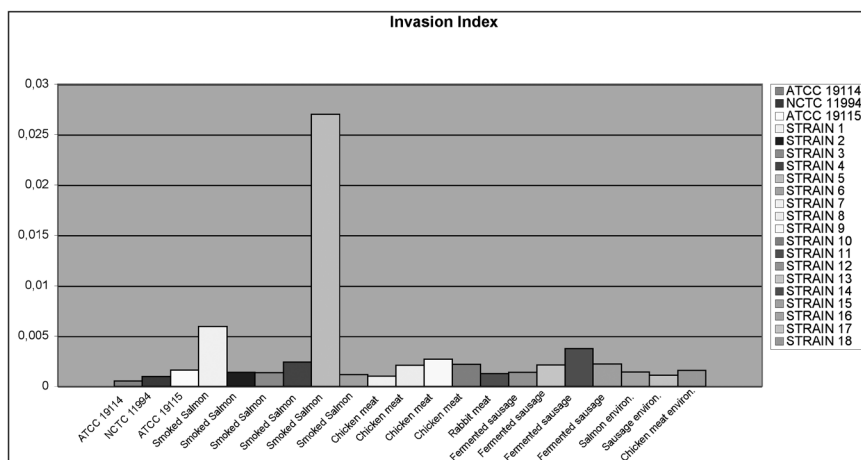


Figure 1: Invasion index of *L. monocytogenes* strains.

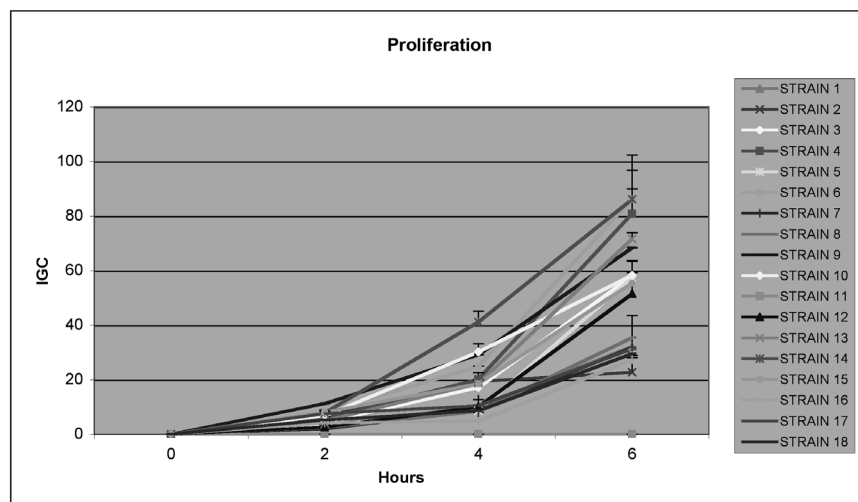


Figure 2: Growth rate of *Listeria monocytogenes* strains tested.

References

1. Braun L., Ohayon H., Cossart P. (1998): The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Molecular Microbiology* 27: 1077.
2. Chao G., Deng Y., Zhou X., Xu Q., Qian X., Zhou L. Zhu B. (2006). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in delicatessen food products in China.

- Food Control* 17: 971-974.
3. Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P. (2004): Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 3819-3822.
4. Dussurget O., Pizzarro-Cerda J., Cossart P. (2004). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual Review in Microbiolpgy* 58: 587-610.
5. Farber J.M., Speirs J.I. (1987). Potential us of continuous cell lines to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 25: 1463-1466.
6. Gaillard J. L., Berche P., Mounier J., Richard S., Sansonetti P. (1987). In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infection and Immunity* 55: 2822-2829.
7. Gattuso A., Gianfranceschi M., Sessa R., Taggi F., Pourshaban M., Aureli P. (2000). In vivo and in vitro assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiologica*, 23, 289-295. Jacquet C., Gouin E., Jeannel D., Cossart P., Rocourt J. (2002): Expression of ActA, Ami, InlB and Listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 616-622.
8. Jaradat Z. W., Bhunia A. K. (2003). Adhesion, invasion and translocation characteristics of *Listeria monocytogenes* serotypes in Caco-2 cell and mouse models. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3640-3645.
9. Larsen C. N., Norrung B., Sommer H. M., Jakobsen M. (2002). In vitro and in vivo invasiveness of different pulsed-field gel electrophoresis types of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5698-5703. Pine L., S. Kathariou, F. Quinn, V. George, Jay D. Wenger, R. E. Weaver (1991): Cytopathogenic effects in enterocytelike Caco-2 cells differentiate virulent from avirulent *Listeria* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 29: 990-996.
10. Roche S. M., Velge P., Bottreau E., Durier C., Van Der Mee N. M., Pardon P. (2001): Assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque-forming assay with HT-29 cells and infection of immuno-competent mice. *International Journal of Food Microbiology* 68, p. 33-44.
11. Stelma G.N. Jr, Reyes A.L., Peeler J.T., Francis D.W., Hunt J.M., Spaulding P.L., Johnson C.H., Lovett J. (1987) Pathogenicity test for *Listeria monocytogenes* using immunocompromised mice. *Journal of Clinical Microbiology* 25: 2085-2089.
12. Terplan G., Steinmeyer S. (1989). Investigations on the pathogenicity of *Listeria* spp. by experimental infection of the chick embryo. *International Journal of Food Microbiology* 8: 277-280.
13. Thévenot D., Dernburg A., Vernozy-Rozand C. (2006). An updated review of *Listeria monocytogenes* in pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology* 101: 7-17.
14. Van Langendonck N., Bottreau E., Bailly S., Tabouret M., Marly J., Pardon

- P., Velge P. (1998): Tissue culture assay using Caco-2 cell line differentiate virulent from non virulent *Listeria monocytogenes* strains. *Journal of Applied Microbiology* 85: 337-346.
15. Vazquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., Kreft J. (2001): *Listeria pathogenesis* and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 584-640.

DIFFERENTIATION OF MUSHROOMS FROM THREE DIFFERENT GEOGRAPHIC ORIGINS BY ARTIFICIAL OLFACTORY SYSTEM (AOS)

*Pinalli R., °Ghidini S., *Dalcanele E., °Bracchi P. G.

KEY WORDS: An Artificial Olfactory Systems (OAS) based on Metal Oxide Semiconductor Sensors (MOS), Geographical origin assessment.

Abstract

An Artificial Olfactory Systems (OAS) based on Metal Oxide Semiconductor Sensors (MOS) was used to analyse samples of *Boletus edulis* (king bolete) mushrooms. The samples were from three different origins: Borgo Val di Taro (Italy), North China and South China. The Artificial Olfactory System together with statistical analysis were able to differentiate the geographical origin of the samples. *Differential Function Analysis* (DFA) were more effective than *Principal component analysis* (PCA) for the differentiation of samples.

Introduction

Consumers show an increasing interest towards the geographic origin of food products. Such an information is considered an additional warranty of quality and authenticity. For several food products the indication of the geographic origin represents also a safety warranty for consumers. This thing happens because while for autochthonous products we very well know the potentially harmful characteristics and the measures to be taken in order to control these harms, products from unknown origins can present unknown hazards.

In the case of typical products which gained the certification of protected designation of origin (PDO) or of protected geographical indication (PGI) verifying the origin of a product means also protection from possible commercial frauds. Analytical techniques able to detect the origin of products have been developed for different categories of food products. Scientific literature is nowadays rich of this kind of papers. Wines and olive oil were the first food items to be studied, but nowadays there are also many papers on oranges used to produce fruit juices. There are different techniques employed to detect the geographic origin of food products: the choice of the analytical technique to be used has to be done keeping in mind which characteristic of the product has to be differentiated. The drawback of many techniques is represented by the fact that they are expansive, time consuming and non conservative. Olfactory

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

*Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi di Parma

systems are promising tools potentially able to overcome these limitations.

The AOS (Artificial Olfactory System or electronic nose) is an instrument which contains an array of sensors with partial specificity and a suitable data processing system. It is capable of characterizing and recognizing simple and complex odors, thus reaching ratings that can be compared to human noses (Gardner J.W., Barlett P.N., 1999). Its principle is different from that of the common analytical instrumentation (GC, GC-MS, HPLC, HPLC-MS, etc...), because it does not analyze the volatile compounds responsible for the aroma, by separating and identifying the different components, but it gives an overall evaluation. Currently the greatest difficulties in setting up an AOS lie in the possibility of guaranteeing an adequate selectivity, as well as repeatability and reproducibility of the measurements. The optimization of these parameters depends essentially on the type of sensors adopted; today different types of sensors are commercially available:

- **MOS** sensors (Metal Oxide Semiconductor) are made of a ceramic sheet, heated internally by an electrical resistance and covered on its surface by a layer of film of oxide semiconductors. Two different types of metal oxide are used:

- donor semiconductors or *n*-type (mainly composed of zinc, tin or iron oxide) responding to oxidizing compounds;

- acceptor semiconductors or *p*-type (mainly composed of nickel or cobalt oxide) responding to reducing compounds;

- Actually, the commercially available most common semiconductor oxide used for the construction of MOS sensors is the tin dioxide (SnO_2).

- Chemistry behind its function is based on a lowering of the electrical resistance caused by the surface oxidization of the analytes and by the reduction of the oxygen previously adsorbed and activated on the sensor surface (Janata J., 1989). These sensors are characterized by low selectivity, high sensibility (ppb level), high humidity resistance and long lifetime (3-5 years).

- **PCS** sensors (Polymer Composite Conductor) are obtained by a mixture of graphite with non conductive polymers: the swelling of the polymer matrix generated by the analytes leads to a reduction of conductivity, that can be correlated to the partition coefficient between the gas and the polymer phase. These sensors are characterized by medium sensibility (to ppm) and medium selectivity (Lonergan M.C. et al., 1996).

- **QCM** sensors (Quartz Crystal Microbalance) are made up of quartz piezoelectric crystal covered by a matrix capable of giving specific interaction with the analytes. Their functioning is based on the reduction of the oscillation frequency of the crystals in relation to the increase in mass of the material due to the temporary interaction of the analytes with the matrix. These sensors have a very high selectivity but a medium-low sensibility (up to 10 ppm) and a response principally depending on temperature variations (Pirondini L., Dalcanale E., 2007).

There are two principal statistical analyses used for the data elaboration:

- *Principal component analysis* (**PCA**) is a statistical technique, introduced

in 1933, which transforms, in a linear way, a primary set of correlated variables into a smaller set of uncorrelated variables, that still contain most of the information of the original data set. The aim is to reduce the dimension of the original data set, to have an indication of how many components are needed to give a reasonable representation of the data. PCA is useless in the case of uncorrelated variables.

- *Differential Function Analysis (DFA)*: if the objects (formed by n variables) of a data set, can be classified into g groups, this analysis finds the linear combinations of the p variables which maximize the ratio of the “between-group” variation and the “within-group” variation. At the end of the statistical analysis process, a linear transformation of the original data matrix is obtained, so that the groups are more discriminate as possible. The linear combinations, which lead to the space transformation, are known as *canonical variates*. As the canonical variates provide discrimination between the groups, the method is also known as *canonical discrimination*. The DFA is applied to the canonical discrimination results and considers the allocation of the objects part of the different g groups. The allocation is based on an allocation law, which is calculated by the observations obtained from a training set (TS), showing a known example of allocation of the objects into the respective groups. This law exploits the distance between the object and an ideal position into the group (Mahalanobis distance).

Materials and methods

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

Sample preparation

Samples of about 0,1 g of dry mushrooms were prepared and put into 25 ml vials, closed with Teflon caps and metal rings.

The nomenclature used for the analyzed samples correspond to:

- it:** edible boletus mushroom from Borgo Val di Taro
- cn:** edible boletus mushroom from North China
- cs:** edible boletus mushroom from South China

Method

- Base line acquisition time: 10 seconds;
- Injection time: 5 seconds;
- Total acquisition time: 160 seconds;
- Delay between two samples: 160 seconds;
- Cleaning cycle: 80 seconds;
- Transport gas: cylinder chromatographic air (80% N_2 , 20% O_2);

- Air flow: 300 mL/min;
- Vial volume: 25 mL;
- Software used for the data acquisition and elaboration: ISE Nose OCS;
- Statistical method used for the data elaboration: DFA.

The total data set is composed of 249 measurements.

Results

The typical plot analysis of the head space of a mushroom sample obtained by MOS sensors, is shown in **Figure 1**. The sensor array response versus time, called sample “fingerprint”, is detected as percentage ratio $\Delta R/R_0$, where R_0 is the resistance value at the beginning of the acquisition (base value), R_s is the absolute instantaneous resistance during the acquisition and ΔR is the differential instantaneous resistance of the sample ($R_s - R_0$).

The MOS sensor response is a variation of the resistance following a reaction with the sample head space molecules, and is substantially an oxidation of the volatile compounds present in the head space with carbon dioxide and aqueous vapour, performed by the oxygen adsorbed on the sensor surface and this process involves all the aroma components (Mielle P., 1996).

The curve recorded presents, at the beginning, a fast decrease of the potential, due to the molecules more easily oxidizable; the minimum of the function corresponds to the maximum resistance variation, due to the high concentration in the head space of molecules with medium values of oxide-reduction potential. The last phase, called the “desorbing phase”, is the gradual return to the resistance base values and it depends on the concentration of the residual molecules in the head space. The fingerprint is therefore a characteristic of the “volatile compounds-sensor array” system and it depends, above all, on the volatile compounds type and quantity, so, from an experimental point of view, on the formation time of the sample head space.

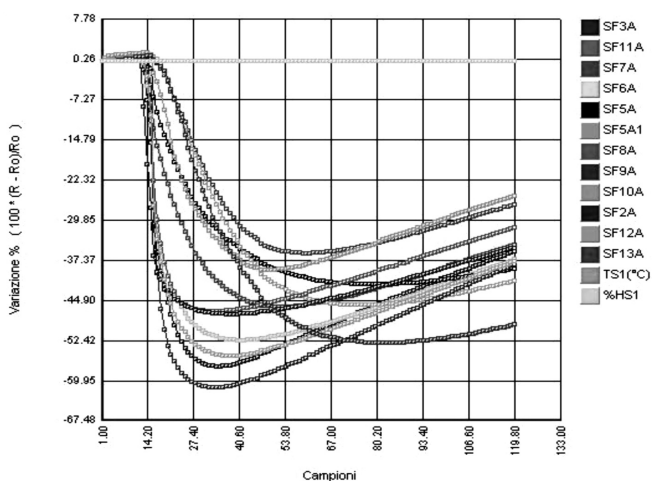


Figure 1: Mushroom typical fingerprint, registered using MOS-AOS with 12 thick layer sensors. Each curve represents the resistance variation (in %) of each sensor.

The analyses were performed dividing the mushroom samples in classes of provenance. Following, the nomenclature used as reported:

- Samples of edible boletus mushroom coming from Borgo Val di Taro class (it)
- Samples of edible boletus mushroom coming from North China class (cn)
- Samples of edible boletus mushroom coming from South China class (cs)

When all the necessary measurements were finished, the data collected were analyzed using DFA. With this kind of elaboration, a discrimination is considered acceptable when it reaches values up to 80%.; values around 85% are considered a signal of good discrimination, while values up to 90% are considered synonymous with an excellent discrimination.

Following, the obtained results are plotted.

At first, all the three classes of mushrooms were considered contemporaneously. The results obtained are shown in **Figure 2**. The three classes are fairly separate, with a light overlap between (cs) and (it) and between (cn) and (it), while (cn) and (cs) classes are perfectly distinct.

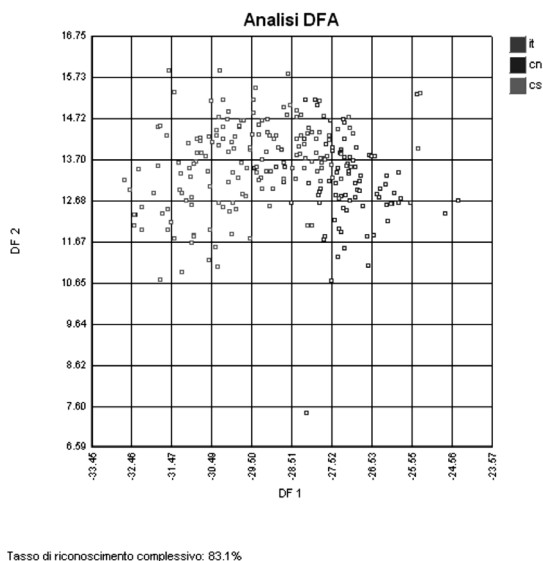


Figure 2: DFA analysis for three classes classification. Discrimination value 83,1%. Data set (sample): 249 measurements. Variables: 11 sensors, 2 features (FT_{module} , $FT_{\text{imaginary}}$), 3 classes to be discriminated. Ratio sample/variables = 3,77

To improve the discrimination value obtained, the mushrooms coming from North China and those coming from South China were considered as a single class (c). The data set now considered is formed of samples from Italy (i) and samples from China (c), so only two classes. **Figure 3** shows the DFA analysis obtained.

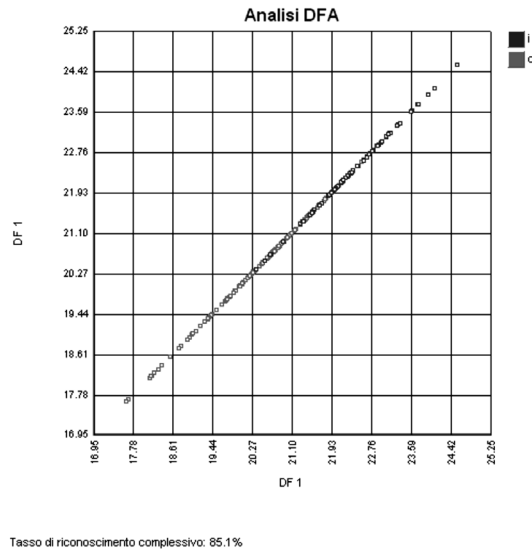


Figure 3: DFA analysis for two classes classification. Discrimination value 85,1%. Data set (sample): 249 measurements. Variables: 12 sensors, 3 features (FT_{real} , $F_{Imaginary}$, Area), 2 classes to be discriminated. Ratio sample/variables = 3,46

A slight improvement of the discrimination level is obtained by this new classification, In fact, the DFA value is now 85,1%.

A further comparison was made between mushrooms coming from Borgo Val di Taro and mushrooms coming from firstly South China and secondly North China, to check the differences and the similarities in the odorous map.

Following, the results are reported.

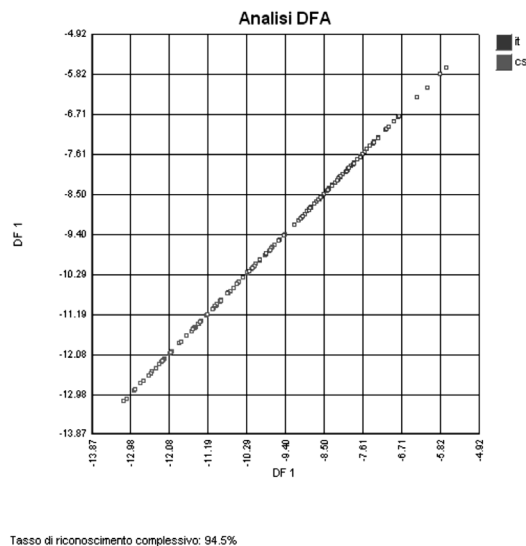


Figure 4: DFA analysis: comparison between Italian mushrooms and South China mushrooms. Discrimination level: 94,5%. Data set (sample): 165 measurements. Variables: 12 sensors, 2 features (Area, FT_{imaginary}), 2 classes to be discriminated. Ratio sample/variables = 3,44

As reported in **Figure 4**, considering the two different classes (it) and (cs), the discrimination level obtained is excellent, 94, 5%.

Comparing the Italian mushrooms (it) to the mushrooms coming from North China (cn), the DFA analysis reached a value of 86,5%, as reported in **Figure 5**.

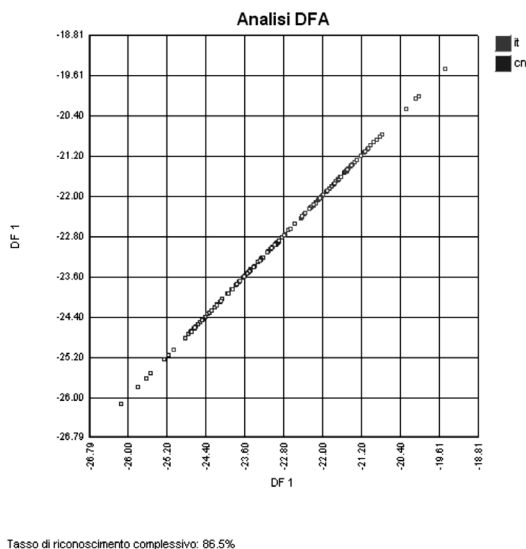


Figure 5: DFA analysis: comparison between Italian mushrooms and North China mushrooms. Discrimination level: 86,5%. Data set (sample): 163 measurements. Variables: 10 sensors, 2 features (Minimum, FTimaginary), 2 classes to be discriminated. Ratio sample/variables = 4,07

In this case the discrimination level between the (it) and the (cn) classes is quite good, up to 85%, but not at the level of the previous case, where the value reached was up to 90%. Considering these last two elaboration data, it seems that, even if quite different, the odorous map of the Italian mushrooms is more similar to that of the mushrooms coming from North China with respect to the mushrooms coming from South China.

Discussion

The analyses performed by the electronic nose show, as reported in **Figure 2**, that if the three classes of mushrooms coming from Italy, North China and South China are considered separately, the samples from Borgo Val di Taro are fairly different from the samples from China, in fact the DFA shows a discrimination level of 83,1% (threshold of acceptable discrimination: up to 80%). A slight discrimination improvement is obtained considering the mushrooms coming from North China and

south China in just one class, therefore monitoring only two classes: samples from Italy and samples from China. In this case the DFA analysis reached a good discrimination level, 85,1% (threshold of good discrimination: up to 85%), as shown in **Figure 3**. Looking again at **Figure 2**, it is evident that the samples coming from North China are totally different from those of South China, while the Borgo Val di Taro mushrooms are located in the middle, lightly overlapped with the North China ones. Therefore, comparing the Italian samples with the North China ones, the DFA analysis shows a quite good discrimination level, 86,5%, as reported in **Figure 5**, while comparing the same samples with the mushrooms from South China the discrimination level obtained is excellent, 94,5% (**Figure 4**).

The Italian mushrooms seem to have, from the aroma point of view, more similar characteristics with mushrooms coming from North China, and the discrimination level is reasonably good, whilst the mushrooms from South China are completely different, and are completely unlike those of the same country. It is interesting to note, in the world map, that the latitude of Italy is very similar to North China and completely different to South China. These aroma fingerprints of the analyzed mushrooms seem to reproduce both these differences and similarities.

Conclusions

The AOS-MOS or electronic nose turned out to be a good tool for the discrimination of the Italian edible boletus mushroom from the China edible boletus mushrooms. The system can also be successfully applied with other traditional analysis methods, normally used for these types of characterizations (Suman M. et al., 2004). The AOS has the double advantage of being fast and low-cost, and does not require particular preparation of the samples which are analyzed in their original form.

Acknowledgements

The research is part of the project “Contenuto in micro e macroelementi dei macromiceti: metabolismo ed uso della composizione per la caratterizzazione dei prodotti locali” funded by Parma University, by 2002 FIL project.

References

1. Gardner J.W., Barlett P.N.: (1999), *Electronic nose: principles and applications*, Oxford University Press, New York, USA, 22.
2. Janata J.: (1989), *Principles of Chemical Sensors*, Plenum Press, New York, USA.
3. Lonergan M.C., Severin E.J., Doleman B.J., Beaber S.A., Grubbs R.H., Lewis N.S.: (1996), Array-Based vapour Sensing Using Chemically Sensitive, Carbon Black-Polymer resistors, *Chem. Mater.*, 8, 2298-2312.
4. Mielle P.: (1996), ‘Electronic noses’: Towards the objective instrumental characterization of food aroma. *Trends in Food Science & Tecnology*, 7, 432-438.

5. Pirondini L., Dalcanale E., (2007), Molecular Recognition at the Gas-Solid Interface: a Powerful Tool for Chemical Sensing, *Chem. Soc. Rev.*, in press.
6. Suman M., Borsellini U., Gabba L., Cristofanilli G., Ricci C., Bordini Cantucci A., Sanfelici S., Colle E., Dalcanale E.: (2004), I sistemi olfattivi artificiali, *Laboratorio 2000*, Giugno/Luglio, 58-63.

STABLE ISOTOPES DETERMINATION IN FOOD AUTHENTICATION: A REVIEW

Ghidini S.[°], Ianieri A.[°], Zanardi E.[°], Conter M.[°], Boschetti T.^{*}, Iacumin P.^{*}, Bracchi. P. G.[°]

Introduction

Authenticity has probably always been a major concern of many consumers (Hargin, 1996), and it is still gaining more and more importance. In Europe, origin is one of the main authenticity issues dealing with food. The European legislation clearly shows this trend. As a matter of fact the trend can be detected already in horizontal sets of rules such as the white paper on food safety, and then in the commission Regulation 178/2002. Vertical sets of rules stress this tendency, for instance bovine meat Regulation CE 1760 17/07/2000 made the indication of origin on meat carcasses mandatory. Commission Directive 2001/110/CE posed the same condition for honey. The EU Commission regulation No 2065/2001 of 22 October 2001 has laid down detailed rules for the application of Council Regulation 104/2000 as regards informing consumers about fishery and aquaculture products. The information includes, between others, the area in which it was caught. In the case of cultivated species, the regulation indicates that a reference should be made to the country in which the product undergoes the final developmental stage.

High quality products with geographical indications and designations of origin following Commission Regulation 509/2006 are generally high-priced and bring in a higher benefit to the producers than ordinary products. So there is a need to protect such products by detecting possible commercial frauds. These products are defined by geographical origin, know-how and in some cases by feeding diet and animal breed.

In order to inform consumers and to protect typical products it must be stressed that while there are several methods suitable for species identification (mostly based on techniques on DNA), there is yet none accepted for the unequivocal determination of the geographical origin. Yet, these are important data necessary to confirm the traceability documentation of the product and to detect frauds. At present knowledge stable isotopes determination looks as the most feasible way to establish the geographical origin of food products.

Stable isotopes

Stable isotopes are those isotopes of an element which are stable and that do not decay through radioactive processes over time. Most elements consist of more

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

^{*}Dipartimento di Scienze della Terra, Università degli Studi di Parma.

than one stable isotope. For instance, hydrogen exists as two stable isotopes ^1H and ^2H (called deuterium), carbon exists as two stable isotopes, ^{12}C and ^{13}C and oxygen exists as three stable isotopes, ^{16}O , ^{17}O , and ^{18}O . In most cases the more abundant stable isotope species typically contains the fewest number of neutrons for that element. Stable isotopes have to be distinguished from radioactive isotopes of an element. Radioactive isotopes have finite life times and undergo a decay to form a different element. The time required for this decay may vary widely ranging from fractions of a second to thousands of years. For instance, carbon has six radioactive isotopes (^9C , ^{10}C , ^{11}C , ^{14}C , ^{15}C , and ^{16}C) of which ^{14}C (which half life is 5730 years) is certainly the best known because of its use in dating biological materials.

Isotope abundances

A brief listing of the stable isotopes and their abundances for the elements most commonly used in food authentication can be seen in Table 1.

Element	Isotope	Abundance (%)
Hydrogen	^1H	99.985
	^2H	0.015
Carbon	^{12}C	98.89
	^{13}C	1.11
Nitrogen	^{14}N	99.63
	^{15}N	0.37
Oxygen	^{16}O	99.759
	^{17}O	0.037
	^{18}O	0.204
Sulfur	^{32}S	95.00
	^{33}S	0.76
	^{34}S	4.22
	^{36}S	0.014
Strontium	^{84}Sr	0.56
	^{86}Sr	9.86
	^{87}Sr	7.02
	^{88}Sr	82.56

Table 1: Stable isotopes and their abundances for the elements most commonly used in food authentication research.

Analytical methods

The variations in the isotopic abundances of hydrogen, carbon, nitrogen, and oxygen isotopes are of particular interest for food authentication studies: the main

components of organic matter. In any case the majority of the elements has stable isotopes that could be useful for this purpose. The use of heavier elements is limited because of the analytical approach usually adopted.

The light elements are typically measured using a gas isotope rationing mass spectrometer. The mass spectrometer consists of a source to ionise the gas, a flight tube with a magnet to deflect the path of the ionised gas, and a detector system at the end of the flight tube to measure the different isotopic species. First, the element of interest must be converted to a gaseous form in order to be analysed into the mass spectrometer. The most commonly used approaches involve introducing hydrogen as H_2 , carbon as CO , nitrogen as N_2 , oxygen as CO_2 and sulphur as SO_2 . Mass spectrometers can analyse only ions therefore, before the gas is introduced, it is ionised by removal of an electron. This process is achieved in that part of the spectrometer usually called ion source. Then as the ionised gas travels down the flight tube (under vacuum or carried by helium), the paths of light and heavy isotopic species are deflected by the magnet of an angle which is direct function of their mass over charge ratio. Detectors are positioned at the end of the flight tube to measure the abundance ratios of the heavy and light isotopic species. The main limitation of this approach is the impossibility to determine the isotopic profile of heavier elements that could be very useful in food authentication. For instance strontium proved to be very useful for the authentication of some foods (Fortunato G. et al.; 2004), but many other elements could be useful. ICP-MS with a time of flight or magnetic field sector spectrometer could be a solution for the analytical problem. Unfortunately both cost and technical complexity still limit the use of these techniques.

Expression of stable isotope abundances

The abundance of stable isotopes is typically presented in delta notation, in which the stable isotope abundance is expressed relative to a standard (equation 1):

$$(1) \delta = (R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}} - 1) \times 1000\text{‰}$$

where R is the molar ratio of the heavy to light isotopes, e.g., Equation (2):

$$(2) R = {}^{13}C/{}^{12}C \text{ or } {}^2H/{}^1H \text{ or } {}^{18}O/{}^{16}O$$

For the most commonly used light isotopes, the internationally recognised standards are shown in Table 2.

Table 2: Internationally recognised standards for the most commonly used light isotopes.

H	Standard Mean Ocean Water (SMOW)	$R = 0.0001558$
C	Pee Dee Belemnite (PDB)	$R = 0.0112372$
N	Atmospheric air (AIR)	$R = 0.0036765$
O	Standard Mean Ocean Water (SMOW)	$R = 0.0020052$
S	Canyon Diablo Triolite (CDT)	$R = 0.0450045$

Causes of stable isotopes variations

The abundances of stable isotopes among different compounds vary because the chemical bond is stronger in molecules containing heavier isotopic forms. This thing makes the breaking a molecule more difficult of in a chemical reaction (kinetic fractionation). With kinetic fractionation, the rate of an enzymatic reaction is faster with substrates that contain the lighter isotopic form than in reactions involving the heavier isotopic form. As a consequence, there will be differences in the abundances of the stable isotopes between substrate and product. Expression of a significant kinetic fractionation in most biological reactions involves substrates at branch points in metabolism, such as the initial fixation of carbon dioxide in photosynthesis. Furthermore the physical properties of molecules containing heavier isotopic forms are different (equilibrium fractionation). Equilibrium fractionation events reflect the observation that during equilibrium reactions, such as the equilibration of liquid and gaseous water, molecules with the heavier isotopic species are typically more abundant in the lower energy state phase.

Isotopic variations in nature

The natural variations in isotopic abundance can be large. Some atmospheric gases, such as CO₂, N₂, and O₂, exhibit limited variation, while N₂O and CH₄ exhibit wide isotopic variation. The larger isotopic ranges in the latter two gases reflect both significant isotopic fractionation by microbes as well as different biological substrates which are used to produce these gases. Oceans, the largest volume of water on earth, exhibit only small variations in isotopic abundance and most of this is associated with changes in salinity; for this reason ocean water is used as a standard (table 2). However, once water evaporates from the oceans and then recondenses as precipitation, there are large isotopic variations that are dependent on both cloud temperature and the amount of residual moisture remaining within the cloud mass. Lakes and rivers reflect precipitation input values, but are often further enriched by evaporative processes, which favour the movement of lighter isotopic forms of water into the vapour phase. There can be significant biological fractionation against carbon dioxide during photosynthesis, which results in plants being isotopically depleted relative to the carbon dioxide substrate.

There is very limited isotopic variation in diatomic nitrogen. The microbial process of nitrogen fixation ($\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+$) exhibits little isotopic fractionation and therefore these products have a similar nitrogen isotope ratio as the atmosphere. Yet subsequent nitrogen transformation reactions exhibit strong isotopic fractionations. In general, the isotopic composition of animals within a trophic level are enriched by about 3‰ relative to their food substrate. The wide variations in nitrogen dioxide reflect the large differences associated with aerobic versus anaerobic processes and industrial versus stratospheric processes. In addition, climate and soil conditions can influence $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in soil (Farrell, Sandercock, Pennock, & Van Kessel, 1996) and therefore the type of plants growing on it. Nitrogen fixing plants (leguminosae) show lower $\delta^{15}\text{N}$ than non-nitrogen fixing plants (Delwiche & Steyn, 1970). The $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$

ratio is more difficult to interpret due to the numerous factors influencing its nature of soil, industrial emissions and sulphur-containing fertilisers (Rossmann, 2001).

The $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio depends only on the types of rocks and soils, and not on human activity, climate or season of production (Rossmann et al., 2000). ^{87}Sr is produced from ^{87}Rb by radioactive β -decay, whereas the abundance of primordial ^{86}Sr remains virtually constant in a given rock. Old acidic rocks such as granite show the highest ratios, mafic and carbonate-rich rocks the lowest.

Isotopic variations in animals

Animals are a very complicated substrate because the isotopic abundances of their tissues and products are the summation of feeds ingested throughout all their life, plus the kinetic fractionations occurring in animal metabolism. The $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio for both milk fat and cheese protein gives information on the type of forage fed to the cows. This because the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio depends almost exclusively on the photosynthetic mechanism used by the plants for CO_2 fixation: the Hatch & Slack cycle or C_4 with $\delta^{13}\text{C}$ mean values of $-12/-14\text{‰}$, and the Calvin cycle or C_3 , with $\delta^{13}\text{C}$ mean values of $-26/-28\text{‰}$ (De Niro and Epstein, 1978 a, b).

Therefore the amount of C_4 plants (mainly maize) in animals' diet can influence the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of products of animal origin. Differences in the $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratio also result essentially from forage. Organic fertilisers and intensive farming methods increase the level of ^{15}N in the soil and consequently in the plants, in milk and in cheese (Mariotti et al., 1981).

The $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratio of milk depends on the water ingested and the proportion of fresh and dry fodder. Isotope ratios of precipitation and groundwater depend largely on temperature, latitude, altitude and distance from the sea (Moser and Rautert, 1980). In grass proper, enrichment in ^{18}O occurs due to fractional evaporation of water. Therefore, during summer, when cows feed almost exclusively on fresh grass, a higher $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratio is observed (Kornel et al., 1997; Rossmann et al., 1998). Similarly, D/H gives the same climate and weather information as does $\delta^{18}\text{O}$.

In summary, in animal tissues, the differences in $^2\text{H}/^1\text{H}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ reflect climatic differences while $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ reflect mainly differences in food resources.

General food

Olive oil (together with wine) is one of the most studied food items with regards to commercial frauds and adulteration. Angerosa et al. (1999) made measurements of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of the whole oil and some of its fractions in order to gain information about the geographical origin of olive oil produced in Greece, Morocco, Spain, Italy, Tunisia, and Turkey. By applying statistical procedures they demonstrated that oil samples show the trend to cluster according to the different climatic areas of growing environment of fruits. Some confusion were observed for samples coming from neighbouring countries having similar climates. Kelly and Rhodes (2002) highlighted emergent techniques such as compound and position specific-isotope mass spectrometry. These latter developments offer the potential to provide more

rapid and improved detection of the economic adulteration of vegetable oils.

In wine IRMS can be used both for origin assignment of samples and to detect adulteration. Gremaud et al. (2004) characterised Swiss vineyards and were able to distinguish five main production zones. They obtained this result by combining via a multivariate approach $\delta^{18}\text{O}$ variations with elemental (Mn, Al, B, Ba, Ca, Fe, Mg, Na, Rb, Sr, Zn) and FT-IR (ethanol, pH, total acidity, volatile acidity, malic acid, fructose, tartaric acid, lactic acid, succinate, citric acid, glycerol, 2,3-butandiol, dry matter and relative density) analyses. Not only carbon and oxygen ratios can be useful for wine authenticity certification, as a matter of fact Almeida and Vasconcelos (2001) set up an ICP-MS for $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ determination and showed that the isotopic profile of strontium is a promising fingerprint of wine origin. Adulteration of wine with glycerol is considered to be a problem in European wine-producing countries. As there is little chance of being able to identify glycerol from different sources on the basis of a method which uses only one isotope, Rossmann et al. (1998) developed a multielement approach using NMR. Glycerol from wine showed the lowest relative enrichment with deuterium, was mainly in position C-2, and had a relatively high ^{18}O content, together with very negative $\delta^{13}\text{C}$ values, which significantly correlated with those of ethanol from the same wines. Isotopic data of glycerol samples from different sources were in agreement with those given by indices of origin. These data allowed identification of the origin of these glycerol samples, i.e. whether they were produced industrially or synthesised by animals or plants. Glycerol of plant origin was most similar to glycerol found in wine. The combination of several isotopic data by discriminant analysis yielded clusters of data obtained from glycerol samples of similar origin. Taking into account the characteristics of possible mixtures, proof that wine has been adulterated depended on the origin and isotope levels of the added compound. It was shown that it is possible to prove that wine has been adulterated with glycerol from other sources when the latter is present at a concentration of 15% of total glycerol content.

As proved by Brescia et al. (2001) IRMS can be a tool suitable to provide information about the geographical origin of durum wheat. As a matter of fact though the application of chemometrics to isotopic determinations they performed the discrimination of semolina by cultivar and geographical origin.

Due to the huge consumption and to the consequently large commercial movements the authenticity of orange juice is an issue too. Pupin et al. (1998) used isotopic analyses to determine the authenticity of Brazilian orange juice. The mean ratios found for these parameters in authentic hand-squeezed orange juice were as follows: $\delta^{13}\text{C} = -26.6\text{‰}$; and $\delta^{18}\text{O} = +2.27\text{‰}$. Simpkins et al. (2000) found similar values for Australian orange juices. The mean of their (273) samples was $\delta^{13}\text{C} -24.77$ (min. -27.3‰ , max. -22.5‰).

Meat and meat products

As already reported isotopic ratios in animals are mainly due to the origin and nature of the feed. This thing make the technique very interesting for typical productions especially for those in which the animals have to follow a particular dietary

regimen fixed by a self imposed set of rules.

Gonzalez Martin et al. (1999) used carbon isotope analysis for characterization and differentiation of Iberian pork meat as a function of the diet of the animal. Using adipose tissue, they classified unknown samples in group of animals designated “acorn-fed”, “recebo=mixed-fed” and “feed raised” according to the $\delta^{13}\text{C}$ value obtained. The same authors (Gonzalez Martin et al., 2001) tried to differentiate the feed received by Iberian swine during fattening (acorns, feed) and their breed (Iberian or White) using analysis of the stable isotopes of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and sulphur ($\delta^{34}\text{S}$) in liver tissue samples. The results obtained in the determination of $\delta^{34}\text{S}$, using a procedure in which organic and inorganic sulphur were converted into BaSO_4 and the procedure that measures $\delta^{34}\text{S}$ in samples of dried ground liver tissue were compared. Joint analysis of carbon and sulphur permitted the differentiation of swine of different breeds receiving different diets (acorns or feed).

Piasentier et al. (2003) evaluated stable isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) in fractions of lamb meat as a method of feeding and geographical origin authentication. Analyses were carried out on meat from 12 lamb types, produced in six European countries and divided in three groups according to the feeding regime during their finishing period: suckled milk only, pasture without any solid supplementation and supplementation containing maize grain. The analyses were made over the longissimus thoracis muscle. $\delta^{13}\text{C}$ values varied significantly in different meat fractions, the difference being higher in protein than in fat (average difference 5.0%). However, the pairs $\delta^{13}\text{C}$ values of crude fat and protein were highly correlated ($r=0.976$) and affected by lamb type in a similar fashion, mainly reflecting animals' feeding regime. Even $\delta^{15}\text{N}$ values of meat protein fraction showed significant differences between lamb types, not dependant on the feeding regime. In fact, lambs fed on similar diets, but in different countries, gave meat with different ^{15}N relative abundances. Renou et al. (2004) characterized meat samples from Charolais steers bred at different geographical sites in France and fed on either maize silage, indoors, or grass. The samples were analyzed using ^{13}C and ^{18}O IRMS. Some parameters showed significant differences according to the production site or feeding. A discriminant factorial analysis allowed the selection of four parameters to identify the production site and diet of the animals. All grazing steers were well classified, as were 94% of the steers fed on maize ensilage.

Milk and dairy products

The determination of the geographic origin of milk (Kornexl et al., 1997; Rossmann et al., 1998) and milk products (Camin et al., 2001; Manca et al., 2001) has recently become possible, by measuring the stable isotope ratios of oxygen ($\delta^{18}\text{O}$) in milk water together with the nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) and carbon ($\delta^{13}\text{C}$) isotope contents of specific milk fractions. The $\delta^{18}\text{O}$ values could be used to define if samples derive from mountain or non-mountain regions. The $\delta^{13}\text{C}$ ratio was found to be highly dependent on the composition of the diet, particularly with regard to maize, a C_4 cycle plant. Finally, the $\delta^{15}\text{N}$ ratio in milk is generally influenced by the intensity of agricultural use.

More recently Knobbe et al. (2006) reinforced these concepts and enriched the knowledge about the influence of the feeding regimen on isotope ratios in animals. They determined the stable carbon and nitrogen isotopic composition of urine and milk samples from cattle under different feeding regimes. The $\delta^{13}\text{C}$ values of milk and urine were dependent on different feeding regimes based on C_3 or C_4 plants. The $\delta^{13}\text{C}$ values are more negative under grass feeding than under maize feeding. The $\delta^{13}\text{C}$ values of milk are more negative compared to urine. Under grass feeding the analysed milk and urine samples are enriched in ^{13}C relative to the feed, whereas under maize feeding the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio of urine is in the same range and milk is depleted in ^{13}C relative to the diet. The difference between the $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios for the two feeding regimes is less pronounced than the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios. The $\delta^{15}\text{N}$ values in urine require more time to reach the new equilibrium, whereas the milk samples show no significant differences between feeding regimes. Brescia et al. (2003) analysed milk samples from 2 geographical areas of the Apulia region, to determine whether their chemical composition could be used to identify their geographical origin. Metal concentrations (Ba, Mn, Zn, Fe and Cu) were determined together with C and N isotopic ratios. Isotopic ratios and Ba concentrations were found to be the most discriminant variables. Ritz et al. (2005) demonstrated that also the breed of cow influences the isotopic enrichments of milk. The effect is, however, of small magnitude and unlikely to diminish the capacity of $\delta^{18}\text{O}$ measurements to discriminate between different diets and production sites. Renou et al. (2004) used of a combination of NMR and IRMS for identification of the geographical origin of milk. They showed that feeds had an influence on fatty acid composition of the milk, whereas production area affected IRMS results. Discriminant analysis results showed that high resolution NMR and IRMS were complementary techniques for the authentication of milk in relation to geographic origin and the feeds. In this study $\delta^{18}\text{O}$ was the most discriminant parameter for both geographic origin and the animal diet.

While there are already many studies on isotope fractions in milk there are very few papers regarding isotopic ratios in cheese. Manca et al. (2001) tried a characterisation of the geographical origin of Pecorino Sardo Cheese by casein stable isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ratios together with free amino acid ratios. They tested cheese from Sardinia, Sicily, and Apulia. Multivariate data treatments revealed good discrimination possibilities for cheeses according to place of origin.

The $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ isotope abundance ratio seems to be extremely powerful the determination of cheese origin. Fortunato et al. (2004) developed an analytical method based on ICP-MS and used it to differentiate cheeses originating from different regions (alpine, pre-alpine, Bretagne, Finland, Canada, Australia) according to local geological properties. While carbon and oxygen isotopic determination in cheese are usually performed on casein fractions in this case no difference was found between "casein-bound" and "whole-cheese" Sr isotope, abundance ratios. Also Pillonel et al. (2003) found the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ isotope abundance ratio to be the most discriminating variable within the ones they considered to differentiate Emmenthal cheeses from six European regions.

Fish

Between foods of animal origin fish is probably the item requiring more authentication techniques than others due to the need of the certification of origin in labels (EU Regulation 104/2000) and to the great number of commercial frauds in this field. Nevertheless only Dempson and Power (2004) used IRMS in fish authentication. They examined stable isotopes of carbon and nitrogen in wild and aquaculture origin Atlantic salmon, to evaluate their utility to identify farmed fish. Samples of muscle tissue obtained from wild salmon were significantly more enriched in nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$: mean = $12.75 \pm 0.38\text{‰}$) but depleted in lipid corrected carbon ($\delta^{13}\text{C}$: mean = $-20.51 \pm 0.23\text{‰}$) by comparison with aquaculture specimens ($\delta^{15}\text{N} = 10.96 \pm 0.19\text{‰}$; $\delta^{13}\text{C} = -19.25 \pm 0.17\text{‰}$) resulting in a complete separation of the two groups.

The research of Sweeting et al. (2007) could be very useful to understand nitrogen isotopic variations in fishes since they assessed the effects of body size, experimental duration and environmental conditions on fish tissue. Two populations of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) were reared on constant diets of dab (*Limanda limanda*) muscle or sandeel (*Ammodytes marinus*) for 2 years under natural light and temperature regimes. Bass were sampled at approximately monthly intervals to determine $\Delta\delta^{15}\text{N}$ for muscle, heart and liver tissue. Mean values of $\Delta\delta^{15}\text{N}$ were 3.83‰, 3.54‰, 2.05‰ (sandeel diet) and 3.98‰, 3.32‰, 1.95‰ (dab diet) for muscle, heart and liver tissue respectively. The assumption that fractionation was independent of body mass was upheld for muscle and heart tissue, but not for liver. Heart and liver $\delta^{15}\text{N}$ were also affected by temperature probably reflecting the metabolic functions of these tissues and their associated rates of turnover. However in heart the explanatory power of temperature appeared tied to that of time.

Honey

Anklam (1998) in his review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey already pointed at IRMS as the most reliable technique for the detection of the geographical origin of honey. The technique can also be used for the detection of adulterations in milk. In particular the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ value can be useful to detect whether honey has been enriched in exogenous sugars. Padovan et al. (2003) used the techniques for this purpose and fixed reference parameters. In particular it was stated that the range of values $\delta^{13}\text{C}$ found for bee-produced honey was -21.96‰ to -30.47‰ for C_3 plants and -11.82‰ to -19.00‰ for C_4 plants. For cane sugar it was -11.33‰ to -11.78‰.

Conclusions

Isotope ratio mass spectrometry is a promising tool for origin assignation of food samples. The technique is sometimes able to distinguish the geographical origin of samples by itself. More frequently it is very effective to use it with other determinations and then combined via multivariate statistics. One of the greatest limitations

to the application of the technique in origin assignation is the lack of large databases of isotopic abundances in food items.

References

1. Almeida C. M., Vasconcelos M. T. S. D. (2001) ICP-MS determination of strontium isotope ratio in wine in order to be used as a fingerprint of its regional origin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16 (6): 607-611.
2. Angerosa F., Breas O., Contento S., Guillou C., Reniero F., Sada E. (1999) Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1013-1017.
3. Anklaam E. (1998) A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63 (4), 549-562.
4. Brescia M. A., Caldarola V., Buccolieri G., Dell'Atti A., Sacco A., (2003) Chemometric determination of the geographical origin of cow milk using ICP-OES data and isotopic ratios: a preliminary study. *Italian Journal of Food Science*, 15, 329-336.
5. Brescia M. A., Di Martino G., Fares C., Di Fonzo N., Platani C., Ghelli S., Reniero F., Sacco A. (2001) Characterization of Italian Durum Wheat Semolina by Means of Chemical Analytical and Spectroscopic Determinations. *Cereal. Chem.*, 79, 238-242.
6. Camin, F., Coloru, G. C., Depentori, D., Franco, M. A., Manca, G., Versini, G. (2001) Dieta-origine geografica, latte e formaggio: riscontri con l'analisi isotopica. In Proceeding of I formaggi d'alpeggio e loro tracciabilità, Bella (pp. 132-145), ALSIA, ANFSOC.
7. De Niro M. J., Epstein, S. (1978a). Carbon isotopic evidence for different feeding patterns in two hyrax species occupying the same habitat. *Science*, 201, 906-908.
8. De Niro M. J., Epstein, S. (1978b). Influence of diet on the distribution of carbon isotope ratios in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 42, 495-506.
9. Dempson J. B., Power M. (2004) Use of stable isotopes to distinguish farmed from wild Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Ecology of Freshwater Fish*. 13, 176-184.
10. Eu Directive 110/2001 *Official Journal of the European Community*, L 10/52 of 12/01/2002
11. Eu Regulation 104/2000 *Official Journal of the European Community*, L 17/22 of 21/01/2000.
12. Eu Regulation 509/2006 *Official Journal of the European Community*, L 93/1 of 31/03/2006.
13. Eu Regulation 2065/2001 *Official Journal of the European Community*, L 278/6 of 23/10/2001.
14. Fortunato G., Mumic K., Wunderli S. Pillonel L. Bosset J. O., Gremaud G. (2004) Application of strontium isotope abundance ratios measured by MC-ICP-MS for food authentication. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*,

- 19 (2): 227-234.
15. Fortunato G., Mumic K., Wunderli S., Pillonel L., Bosset J. O., Gremaud G. (2004) Application of strontium isotope abundance ratios measured by MC-ICP-MS for food authentication. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19, 227-234.
16. Gonzalez Martin I., Gonzalez-Perez C., Hernandez Mendez J., Marques Macias E., Sanz Poveda F. (1999) Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian-breed swine. *Meat Science*, 52, 437-441.
17. Gonzalez Martin I., Gonzalez-Perez C., Hernandez Mendez J., Sanchez Gonzalez C. (2001) Differentiation of dietary regimen of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and sulphur in hepatic tissue. *Meat Science*, 58, 25-30.
18. Gremaud G., Quaile S., Piantini U., Pfammatter E., Corvi C. (2004) Characterization of Swiss vineyards using isotopic data in combination with trace elements and classical parameters. *European Food Research and Technology*, 219, 97-104.
19. Hargin, K. D. (1996) Authenticity issues in meat and meat products. *Meat Science*, 43 (supplement), 277-289.
20. Kelly S. D., Rhodes C. (2002) Emerging techniques in vegetable oil analysis using stable isotope ratio mass spectrometry. *Grasas y Aceites*, 53, 34-44.
21. Knobbe N., Vogl J., Pritzkow W., Panne U., Fry H., Lochotzke H.M., Preiss-Weigert A. (2006) C and N stable isotope variation in urine and milk of cattle depending on the diet, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386 (1), 104-108.
22. Kornel, B. E., Werner, T., Rossmann, A., & Schmidt, H.L. (1997) Measurement of stable isotope abundances in milk and milk ingredients: a possible tool for origin assignment and quality control. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 205(1), 19-24.
23. Manca G., Camin F., Coloru G. C., Del Caro A., Depentori D., Franco M. A., Versini G. (2001) Characterization of the Geographical Origin of Pecorino Sardo Cheese by Casein Stable Isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) Ratios and Free Amino Acid Ratios. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1404-1409.
24. Padovan G.J., De Jong D., Rodrigues L.P., Marchini J.S. (2003) Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio. *Food Chemistry*, 82, 633-636.
25. Piasentier E., Valusso R., Camin F., Versini G. (2003) Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. *Meat Science*, 64, 239-247.
26. Pillonel L., Badertscher R., Froidevaux P., Haberhauer G., Holzl S., Horn P., Jakob A., Pfammatter E., Piantini U., Rossmann A., Tabacchi R., Bosset J.O. (2003) Stable isotope ratios, major, trace and radioactive elements in emmental cheeses of different origins. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 36, 615-623.
27. Pupin A. M., Dennis M. J., Parker I., Kelly S., Bigwood T., Toledo M. C. F. (1998) Use of isotopic analyses to determine the authenticity of Brazilian

- orange juice (*Citrus sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1369-1373.
28. Kornel B. E., Werner T., Rossmann A., Schmidt H. L. (1997) Measurement of stable isotope abundances in milk and milk ingredients - A possible tool for origin assignment and quality control. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 205, 19-24.
29. Renou J. P., Bielicki G., Deponge C., Gachon P., Micol D., Ritz P. (2004) Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry. Part II. Beef meat. *Food Chemistry*, 86, 251-256.
30. Renou J. P., Deponge C., Gachon P., Bonnefoy J. C., Coulon J. B., Garel J. P., Verite R., Ritz P. (2004) Characterization of animal products according to geographic origin and feeding diet using nuclear magnetic resonance and isotope ratio mass spectrometry: cow milk. *Food Chemistry*, 85, 63-66.
31. Ritz P., Gachon P., Garel J.-P., Bonnefoy J.-C., Coulon J.-B., Renou J.-P. (2005) Milk characterization: Effect of the breed, *Food Chemistry*, 91 (3), 521-523.
32. Rossmann A., Schmidt H. L., Hermann A., Ristow R. (1998) Multielement stable isotope ratio analysis of glycerol to determine its origin in wine. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A/Food-Research-and-Technology*, 207(3): 237-243; 28 ref.
33. Rossmann, A., Kornel, B., Versini, G., Pichlmayer, F., & Lamprecht, G. (1998) Origin assignment of milk from alpine regions by multielement stable isotope ratio analysis (SIRA). *La Rivista di scienza dell'alimentazione*, 27(1), 9-21.
34. Simpkins W. A., Patel G., Harrison M., Goldberg D. (2000) Stable carbon isotope ratio analysis of Australian orange juices. *Food Chemistry*, 70 (3), 385-390.
35. Sweeting C.J., Barry J., Barnes C., Polunin N.V.C., Jennings S. (2007) Effects of body size and environment on diet-tissue $\delta^{15}\text{N}$ fractionation in fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 340 (1), pp. 1-10.
36. Wen Yeh H., Wang W. M. (2001) Factors Affecting the Isotopic Composition of Organic Matter. Carbon Isotopic Composition of Terrestrial Plant Materials. *Carbon Isotope of Terrestrial Plants*, 3, 137-147.

IL RUOLO DELLA SPECIE BOVINA E DI ALTRI RUMINANTI NELL'EPIDEMIOLOGIA DELLE INFEZIONI DA *ESCHERICHIA COLI* VEROCITOTOSSICI

THE ROLE OF CATTLE AND OTHER RUMINANTS IN THE EPIDEMIOLOGY OF VEROCYTOTOXIN - PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* INFECTIONS

Silvia Bonardi¹, Carola Leccese²

PAROLE CHIAVE:

VTEC O157, VTEC non-O157, bovino, ruminanti, epidemiologia.

KEY WORDS:

VTEC O157, non-O157 VTEC, cattle, ruminants, epidemiology.

Riassunto

La presente review illustra le caratteristiche degli stipiti di *Escherichia coli* produttori di verocitotossine (VTEC), in particolare per quanto riguarda i fattori di virulenza, e indica i sierogruppi/sierotipi prevalenti sia nelle infezioni umane, sia negli animali serbatoio. In particolare si affronta il tema degli animali che fungono da "reservoir" di tali microrganismi, il bovino in particolare, ma anche il bufalo, la pecora, la capra e i ruminanti selvatici, mettendo in risalto soprattutto i risultati degli studi epidemiologici eseguiti in Italia. Accanto al ruolo dell'animale, è anche evidenziato il ruolo degli alimenti, da essi derivati, che hanno dato prova di poter veicolare all'uomo stipiti VTEC O157 e non-O157.

Summary

In this review, the features of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) were studied, in particular those regarding the microorganism virulence factors. The distribution of different serogroups/serotypes in human infections and animal reservoirs was also discussed. Nevertheless, the major goal of the review was the

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

² - Veterinario libero professionista

Correspondence: Prof. Silvia Bonardi

Dipartimento di Salute Animale - Sezione di Ispezione degli alimenti di origine animale

Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Parma

Via del Taglio n° 8 - 43100 Parma - Tel. 0039/0521/032718

E-mail: silvia.bonardi@unipr.it

role of the animals as VTEC reservoirs: cattle in particular, but also buffaloes, sheep, goats, and wild ruminants. The authors reported the results of several international studies, but focused mainly on Italian epidemiological surveys. Apart from the animals, the role of foodstuffs of animal origin in the transmission of VTEC strains to humans was investigated.

Introduzione

Escherichia coli è un batterio Gram negativo, appartenente alla vasta famiglia delle Enterobacteriaceae, generalmente conosciuto come un normale saprofita dell'intestino dell'uomo e degli animali (3).

All'inizio degli anni '80 sono stati identificati ceppi di *E. coli* in grado di elaborare una potente tossina simile a quella prodotta da *Shigella dysenteriae* di tipo 1, capace di indurre effetto citopatico su monostrati di cellule Vero. Questi ceppi sono stati denominati *E. coli* verocitotossici (VTEC) o *E. coli* produttori di tossine Shiga-like (STEC) (44, 45).

La scoperta degli stipiti VTEC è legata a due focolai epidemici riconducibili ad una tossinfezione alimentare, che si verificarono nel 1982 negli Stati Uniti e che il Centers for Disease Control and Prevention (CDC) di Atlanta associò ad *E. coli* che esprimeva l'antigene somatico O:157 e l'antigene flagellare H:7, un sierotipo allora ritenuto raro (53).

Da quegli anni, e in particolare dopo il verificarsi di numerosi focolai tossinfettivi segnalati dal CDC di Atlanta, *E. coli* O157:H7 venne considerato un microrganismo altamente patogeno per l'uomo, capace di indurre quadri sintomatologici estremamente variabili. Da una lieve diarrea di tipo acquoso, il quadro clinico infatti può evolvere in colite emorragica, eventualmente complicata dalla sindrome emolitico-uremica (SEU) o dalla porpora trombocitopenica (PTT) (37).

E. coli O157:H7 e la variante immobile O157:H- non sono i soli *E. coli* produttori di verocitotossine patogeni per l'uomo, in quanto altri sierotipi sono in grado di indurre quadri clinici indistinguibili da quelli descritti per VTEC O157. Stipiti VTEC appartenenti a numerosi sierotipi sono stati, infatti, descritti in diverse specie, soprattutto ruminanti come il bovino, la pecora e la capra (7, 16).

I sintomi che caratterizzano la colite emorragica si presentano a distanza di 1-2 giorni dall'ingestione di alimenti contaminati da VTEC (37). In una prima fase il soggetto presenta crampi addominali, seguiti dall'instaurarsi di una forma leggera di diarrea. In pochi giorni la diarrea da acquosa diventa emorragica ed è accompagnata da dolori addominali di forte intensità (49). Nella maggior parte dei casi la malattia si risolve senza conseguenze, ma nel 3-7% dei pazienti può invece evolvere in una forma sistemica, la sindrome emolitico-uremica (SEU), soprattutto nei bambini di età inferiore ai 5 anni e negli anziani (37).

La SEU si instaura per le lesioni vascolari indotte dalle tossine a carico degli endoteli dei glomeruli renali. Come conseguenza del danno endoteliale, si verifica un accumulo di piastrine in sede corticale renale, con formazione di trombi e piastrinopenia. Il passaggio dei globuli rossi all'interno dei vasi lesionati ne determina la rottura, con conseguente anemia emolitica microangiopatica. Le lesioni renali portano

ad un quadro di insufficienza renale acuta, caratterizzato da anuria o oliguria. La SEU è infatti caratterizzata dalla triade sintomatologica anemia emolitica microangiopatica, piastrinopenia e insufficienza renale acuta. L'aumento della volemia conseguente alla ritenzione idrica può indurre sintomi di tipo neurologico, quali convulsioni, sonnolenza e stato comatoso. Se la malattia non viene diagnosticata e correttamente trattata, la sintomatologia si complica con tutti i segni dell'insufficienza renale acuta (ipertensione, ritenzione idrica fino all'edema polmonare acuto) (61).

La porpora trombotica trombocitopenica (PTT) si manifesta prevalentemente nei soggetti adulti; il quadro clinico è caratterizzato da anemia emolitica microangiopatica, trombocitopenia e problemi neurologici. I danni vascolari sono a carico di diversi organi e per questo motivo il quadro clinico risulta più severo. A differenza della SEU, la PTT è causata da minori danni al rene, ma di disturbi più gravi a carico del sistema nervoso centrale, è meno prevedibile e gli esiti sono meno favorevoli per il paziente (39).

La trasmissione dell'infezione risiede spesso nell'assunzione di alimenti contaminati da stipiti VTEC (carne cruda o poco cotta, latte e derivati non pastorizzati, acqua contaminata, verdure non lavate accuratamente), ma non va trascurato il ruolo dei portatori asintomatici (61).

VTEC: caratteristiche e terminologia

Gli stipiti VTEC elaborano due citotossine (VT1 e VT2), codificate dai geni batteriofagici *vtx1* e *vtx2*, che rappresentano il loro fattore di virulenza determinante. Della VT1, per lungo tempo considerata una tossina altamente conservata, sono state individuate di recente due varianti, denominate VT1c e VT1d. Per la VT2 le varianti, note da tempo, sono denominate VT2c, VT2d, VT2e, VT2f e VT2g (57). Le tossine VT consistono di cinque subunità B identiche, responsabili del legame al recettore glicolipidico Gb3 presente sulla membrana delle cellule eucariote, e di una singola subunità A che, dotata di attività enzimatica, agisce sull'RNA ribosomiale e interrompe la sintesi proteica, causando la morte della cellula (38). Le VT vengono prodotte nel colon e per via ematica raggiungono le cellule endoteliali arteriolari del rene e del grosso intestino, che nell'uomo sono ricche di recettori Gb3, provocando seri danni a tali distretti vascolari (2). È stato anche dimostrato che le VT inducono apoptosi a carico delle cellule dell'epitelio intestinale (30). Oltre alla sintesi delle VT, un altro fattore associato alla virulenza espresso dagli stipiti VTEC è rappresentato da una proteina di membrana detta intimina, responsabile dell'adesione dei VTEC alle cellule dell'epitelio intestinale. L'adesione e le conseguenti modificazioni citoscheletriche a carico dell'enterocita portano alla caratteristica lesione A/E (attaching - effacing; adesione - elisione) con scomparsa dei microvilli e formazione di tipiche strutture a piedistallo che sostengono il batterio adeso. L'intimina è codificata dal gene cromosomiale *eae*, che fa parte dell'isola di patogenicità denominata "locus for enterocyte effacement" (LEE) (32). La diarrea severa, e soprattutto le forme di colite emorragica e di SEU, sono strettamente associate agli stipiti VTEC che sono provvisti del gene *eae*. Un altro fattore che può influire sulla virulenza degli *E. coli* verocitotossici è l'enteroemolisina (Ehx), una "pore-forming toxin" monomerica che si inserisce nel-

la membrana cellulare delle cellule eucariote, provocando la formazione di pori (5). I geni che codificano l'Ehx sono localizzati su un plasmide di 60 mDal, denominato plasmide pEHEC (35).

Il termine *E. coli* verocitotossico o *E. coli* che produce verocitotossine (Verocytotoxin-producing *E. coli*, VTEC) è stato coniato dopo la dimostrazione che i filtrati colturali di alcuni ceppi di *E. coli* erano in grado di indurre effetto citopatico irreversibile su monostrati di cellule Vero (34), o successive osservazioni (33) che riportarono casi sporadici di SEU in associazione alla presenza contemporanea di una citotossina e di stipiti di *E. coli* nelle feci dei pazienti. Altri studi (44) riportarono che certi stipiti di *E. coli* erano capaci di produrre una tossina simile a quella di *Shigella dysenteriae* di tipo I (Shiga-Like Toxin, SLT), che aveva effetto citopatico sulle cellule HeLa come la tossina prodotta da *Shigella*. In seguito fu dimostrato che la tossina Shiga-like e la Verocitotossina erano la medesima tossina (45) e che il ceppo di *E. coli* O157:H7 descritto nei focolai tossinfettivi statunitensi del 1982 (53) era capace di produrla. Gli studi effettuati in quel periodo portarono ad un sistema di nomenclature parallele, che si ripresenta ancora oggi, per cui STEC (Shiga Toxin - producing *E. coli*) e VTEC sono acronimi equivalenti che si riferiscono a ceppi di *E. coli* che producono una o più tossine appartenenti alla famiglia delle Shiga Toxin (Stx) (43).

Una definizione che invece tiene conto del quadro clinico associato all'infezione predilige il termine *Escherichia coli* enteroemorragici (Enterohaemorrhagic *E. coli*, EHEC) per gli stipiti capaci di produrre le tossine, di indurre la lesione A/E a carico degli enterociti e di sintetizzare l'enteroemolisina (35). In un certo senso, tale definizione considera gli stipiti EHEC come i microrganismi capaci di indurre i quadri più severi di malattia (colite emorragica, SEU), mentre l'acronimo VTEC starebbe ad indicare i ceppi di *E. coli* produttori solo di verocitotossine e quindi privi, in particolare, del gene *eae*.

Molto interessante è la suddivisione dei microrganismi in linee evolutive diverse, a seconda del loro potere patogeno per l'uomo. La linea EHEC-1 comprende *E. coli* O157:H7 e stipiti ad esso strettamente correlati (quali O145:H-) che sono altamente patogeni per l'uomo, potendo indurre colite emorragica, SEU e PTT. Sono ceppi derivati dallo stipite EPEC O55, storicamente considerato il progenitore di questi microrganismi. La linea EHEC-2 raggruppa, invece, tutti gli stipiti EHEC che appartengono a sierogruppi diversi (ad esempio O5, O26, O103, O111, O118, ecc.) e che sono in grado di provocare, nell'uomo, quadri diarroici, colite emorragica e SEU. I ceppi compresi nella linea VTEC-1 appartengono al sierogruppo H21 (come O91, O113, ecc.) e nell'uomo causano SEU e PTT. Infine, all'ultimo gruppo appartengono gli stipiti della linea evolutiva VTEC-2, che comprendono ceppi VTEC poco o affatto patogeni, associati ad infezioni asintomatiche, forme lievi di diarrea e, raramente, a casi di SEU (35).

Infine, per completare il discorso sulla terminologia di questi microrganismi, va ricordato che il Comitato Scientifico per le misure veterinarie in relazione alla sanità pubblica (Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health, SCVPH) dell'Unione Europea, in un parere emesso il 21-22 gennaio 2003 (59), per gli *E. coli* verocitotossici patogeni per l'uomo ha utilizzato il termine HP-VTEC (Human Pathogenic - VTEC). Questo acronimo comprende, in effetti, tutti gli stipiti

capaci di indurre malattia nel consumatore, indipendentemente dalle caratteristiche del quadro clinico e dalla presenza di singoli geni associati alla virulenza.

***E. coli* O157**

Escherichia coli O157 (con i sierotipi O157:H7 e O157:H-), negli ultimi anni, si è imposto all'attenzione internazionale come importante patogeno veicolato dagli alimenti, in grado di causare danni severi all'uomo, con conseguenze potenzialmente letali. Molto è noto su questo microrganismo, ma le caratteristiche da non trascurare nell'epidemiologia della tossinfezione alimentare sono la sua spiccata acidotolleranza, che ne ha permesso la sopravvivenza anche in alimenti particolarmente acidi come il sidro di mela, e la bassa dose infettante, stimata talvolta inferiore alle 50 cellule (60).

***E. coli* non-O157**

A tutt'oggi, vengono riportati numerosi casi di infezione umana da VTEC non-O157, come per esempio O26:H11 o O26:H⁻, O91:H21 o O91:H⁻, O103:H2, O111:H⁻, O113:H21, O117:H7, O118:H16, O121:H19, O128:H2 o O128:H⁻, O145:H28 o O145:H⁻ e da O146:H21 (6, 14, 15, 24, 40, 46, 58, 63), ma il ruolo di altri sierotipi rimane ancora da chiarire. Nei diversi paesi europei ed extraeuropei, quali Stati Uniti, Canada, Giappone, Argentina, i sierogruppi VTEC più comunemente isolati dall'uomo sono comunque rappresentati da O26, O103, O111 e O145, tutti patogeni capaci di provocare severi quadri clinici (36, 46, 56, 58, 63).

Purtroppo le indagini sul ruolo degli animali nell'epidemiologia dei VTEC non-O157 sono piuttosto scarse e perciò in molti focolai di infezione umana non è possibile stabile un legame con animali serbatoio (29).

Fino a pochi anni fa si riteneva che il sierogruppo O26 fosse isolabile esclusivamente dai bovini e dai prodotti da essi derivati (4) ma recentemente stipiti VTEC O26 sono stati isolati anche da ovini non affetti da disturbi gastro-enterici (8). Indagini microbiologiche volte all'isolamento di VTEC appartenenti a sierogruppi diversi da O157 in feci bovine, hanno sempre individuato ceppi VTEC O26 in un numero significativamente più elevato di campioni rispetto ai sierogruppi O103, O111 e O145 (29, 47). Gli stipiti VTEC O26 possono essere considerati patogeni sia per l'uomo che per gli animali (4).

E. coli O111 è probabilmente il sierogruppo VTEC non-O157 più importante, poiché responsabile di un gran numero di epidemie umane. Gli stipiti VTEC O111 vengono isolati dal bovino (4), anche se recenti indagini condotte in Scozia (47), Inghilterra (29) e Italia (Bonardi, dati non pubblicati) non hanno mai identificato *E. coli* O111 nelle feci bovine. Più scarsi i dati relativi al sierogruppo O145, isolato da bovini asintomatici e dalle carni da essi derivate (4). Infine, VTEC O103 è stato isolato da feci bovine, anche se con prevalenze piuttosto modeste se comparate a quelle del sierogruppo O26 (29, 47).

Indagini recenti eseguite in Italia hanno portato all'isolamento di vari sierogruppi di *E. coli* produttori di verocitotossine dalle feci di bovini macellati, quali

O74, O109, O110, O116, e O117, provvisti dei geni *vtx1* e/o *vtx2*, ma privi del gene *eae*, oltre al sierotipo O91:H-, responsabile nell'uomo sia di infezioni enteriche non complicate, sia di quadri molto severi (sindrome emolitico-uremica), ed al sierogruppo patogeno O26 (12, 13).

Ruolo epidemiologico della specie bovina e di altri ruminanti nella trasmissione di *E. coli* produttori di verocitotossine

Il sospetto che il bovino potesse essere un *reservoir* di *E. coli* O157:H7 è andato consolidandosi durante il primo focolaio del 1982, legato al consumo di carne bovina macinata in alcuni Stati USA. Prima di allora questo sierotipo non era mai stato isolato da campioni carnei (53). In seguito, in diversi paesi è stato dimostrato che questo microrganismo è presente, con prevalenze variabili, nel tratto gastrointestinale dei bovini. L'acido-tolleranza del microrganismo potrebbe rappresentare un fattore di adattamento all'ambiente lievemente acido del rumine e la presenza del batterio in altri ruminanti sostiene infatti questa ipotesi (1). Tuttavia, contrariamente a quanto suggerito dalla presenza del rumine, è stato individuato un altro sito di colonizzazione di *E. coli* O157:H7, e precisamente la mucosa della giunzione retto-ale del bovino (28, 41, 52). L'escrezione fecale si protrae, generalmente, per meno di due mesi, ma alcuni bovini possono rimanere colonizzati per periodi più lunghi (35).

Gli alimenti responsabili della trasmissione all'uomo spesso derivano dal bovino, come carni crude o poco cotte e latte non pastorizzato. La contaminazione avviene durante la mungitura o nelle fasi di macellazione e lavorazione della carcassa. Alimenti originati da altri ruminanti, come latte di capra e formaggi caprini a latte crudo, carne di cervo, ecc., seppure in misura minore, sono stati coinvolti in episodi tossinfettivi (35).

In Italia sono stati effettuati diversi studi per dimostrare il ruolo del bovino come *reservoir* di VTEC O157. La prevalenza dei portatori intestinali tra i bovini macellati può variare dallo 0 al 16,5% e dipende dall'età e dallo stato nutrizionale dei bovini esaminati, nonché dalla stagione dell'anno e dai metodi analitici utilizzati (10, 11, 19). La variabilità nell'escrezione può incidere sulla contaminazione della carcassa durante il processo di macellazione, che si presenta anch'essa piuttosto variabile (11).

E. coli O157:H7 non è patogeno per il bovino adulto, dove si comporta da commensale, e solo in casi eccezionali è in grado di causare diarrea nel vitello (22, 31). Nel vitello con diarrea i sierotipi EHEC più importanti sono O5:H-, O26:H-, O26:H11, O111:H- e O118:H16, comunque associati con malattia anche nell'uomo. Dal bovino adulto, asintomatico, si possono isolare diverse decine di sierogruppi di *E. coli* produttori di verocitotossine, molti dei quali patogeni anche per l'uomo. Attualmente solo una minoranza dei microrganismi isolati dal bovino appartiene al sierogruppo O157, mentre tra i non-O157, si segnala con una certa frequenza l'isolamento dei sierogruppi O5, O26, O103, O111, O118 e O145 (35).

A discapito della rilevanza che assume il bovino nell'epidemiologia dell'infezione, le carni bovine, ed in particolare quelle macinate, che rappresentano uno degli alimenti a maggior rischio, raramente risultano contaminate. È quanto si è osservato

in un'indagine eseguita sull'intero territorio nazionale da 9 dei 10 Istituti Zooprofilattici Sperimentali, che hanno esaminato 931 campioni di carne bovina macinata ed hanno riscontrato ceppi VTEC O157 solo in quattro (0,43%) campioni carnei. Nello stesso studio sono stati esaminati anche 2948 prodotti a base di latte, dai quali non sono mai stati isolati stipiti di *E. coli* verocitotossici. I prodotti lattiero-caseari erano rappresentati da formaggi a latte crudo o pastorizzato, con meno di 60 giorni di stagionatura, prodotti con latte vaccino o con latte ovino, nonché da mozzarelle di bufala (21). Questa indagine, eseguita su vasta scala, ha indubbiamente evidenziato la forte discrepanza esistente tra il ruolo dell'animale portatore, da un lato, e la reale contaminazione dell'alimento, dall'altro, a tutto vantaggio del consumatore. Tuttavia, in uno studio eseguito nella regione Piemonte, si è rilevata un'elevata prevalenza di *E. coli* patogeni (EPEC, VTEC, ETEC) in formaggi prodotti sia a partire da latte crudo, che da latte trattato termicamente. Tra gli stipiti di *E. coli* verocitotossici è stato isolato un ceppo VTEC O26 (23).

Recentemente, nel nostro paese, è stato messo in luce il ruolo del bufalo (*Bubalus bubalis*) quale serbatoio di VTEC O157. In Campania, regione in cui la bufala è allevata per la produzione della mozzarella e per il consumo di carne, in forte crescita, un'indagine eseguita su 289 animali appartenenti a 65 allevamenti, ha evidenziato una prevalenza media di escretori fecali pari al 14,5%. Tutti gli stipiti di *E. coli* erano positivi per le sequenze geniche *vtx2*, oppure *vtx1* e *vtx2*, assieme al gene *eae* (26). Un'indagine triennale, eseguita sempre nella regione campana su diversi stabilimenti adibiti alla produzione della mozzarella di bufala, non ha invece mai riscontrato stipiti VTEC O157 nei prodotti (27) che, secondo il disciplinare, vengono ottenuti da latte non sottoposto a trattamento termico. Il raggiungimento delle temperature idonee alla filatura della pasta (58-65°C) è possibile mediante aggiunta, alla cagliata, di acqua che può raggiungere i 95°C (Decreto 10 maggio 1993): è proprio il rispetto delle condizioni igieniche durante il processo di filatura, ed il controllo delle contaminazioni post-processo, che garantisce la salubrità del prodotto finito.

Gli studi epidemiologici eseguiti sulla specie ovina hanno evidenziato la presenza di stipiti di *E. coli* O157 produttori di verocitotossine nelle feci di animali macellati in Gran Bretagna, con prevalenze variabili dal 2,2 % (17) al 7,5% (18). In Spagna, è stato dimostrato che una minoranza di agnelli (1%) eliminava VTEC O157 con le feci, a confronto del 35% dei soggetti che invece eliminavano stipiti VTEC appartenenti a 22 sierogruppi diversi, tra i quali O6, O91, O117, O128, O146, O166 (50). Molti sierotipi di *E. coli* verocitotossici isolati dalle pecore sono patogeni per l'uomo: in particolare, i sierotipi O76:H19, O91:H-, O128:H-, O128:H2 e O157:H7 sono responsabili di gravi infezioni che possono culminare con la sindrome emolitico uremica (50). In Italia, nella regione Lazio, sono stati isolati stipiti VTEC O157 dal latte ovino con una prevalenza pari allo 0,6% dei campioni esaminati e questo suggerisce che anche nel nostro paese le pecore possano fungere da *reservoir* di *E. coli* produttori di verocitotossine (54). Sempre dal latte ovino e da formaggi prodotti con latte ovino, in Spagna sono stati isolati diversi sierogruppi di *E. coli* verocitotossici, ma nessuno appartenente al sierogruppo O157 (51).

Accertato il ruolo della capra quale serbatoio di VTEC O157 (65), il latte caprino si dimostra il veicolo con il quale di norma il microrganismo, da questa

specie animale, può essere trasmesso all'uomo. Uno studio eseguito in provincia di Bergamo, ha infatti identificato uno stipo di *E. coli* O157 produttore di VT2 ed *eae* positivo in latte crudo di capra (48). Anche in Spagna, dal latte crudo di capra, ma non da formaggi caprini, è stato isolato VTEC O157 (51).

Per completare le conoscenze sul ruolo dei ruminanti quali serbatoi di *E. coli* verocitotossici, è stato studiato anche il ruolo dei selvatici. Da cervi, camosci e caprioli abbattuti o ritrovati morti nelle province di Trento e Pordenone è stato testato il contenuto intestinale ed alcuni soggetti (lo 0,3% dei caprioli e l'1,5% dei cervi) sono risultati positivi per VTEC O157. La presenza di questi microrganismi nelle feci dei ruminanti selvatici merita sicuramente ulteriori accertamenti, in quanto potrebbe esistere sia la circolazione di VTEC O157 in ambito selvatico, quanto la loro acquisizione da pascoli frequentati da ruminanti domestici (20).

Un'ipotesi molto interessante suggerisce che i ceppi VTEC isolati dall'uomo rappresentino popolazioni diverse da quelle riscontrabili negli animali, come per esempio nel bovino, o che ne siano soltanto una sottopopolazione. Pertanto, anche se gli stipi isolati dall'uomo e dagli animali di fatto condividono gli stessi antigeni di superficie e gli stessi meccanismi di virulenza, non è ancora chiaro se si tratti di medesimi cloni o, semplicemente, di sottopopolazioni diverse tra loro (9).

Conclusioni

Le infezioni da stipi VTEC rappresentano un serio problema di sanità pubblica in tutti i paesi industrializzati, in particolare USA, Europa, Giappone, Canada e Australia. In questi paesi si sono verificati focolai epidemici di vaste proporzioni a carico di consumatori che avevano assunto lo stesso alimento contaminato (42).

Il quadro saliente dell'epidemiologia delle infezioni da *E. coli* verocitotossici comprende: il tratto gastroenterico del bovino e di altri animali come serbatoio di microrganismi, la trasmissione attraverso un'ampia varietà di alimenti e una dose infettante bassa, che determina alte percentuali d'attacco e la possibile trasmissione interpersonale (42).

In Italia, dal 1988, è stato istituito un sistema nazionale di sorveglianza volontario della sindrome emolitico-uremica in età pediatrica. Dal 1988 al 2005 sono stati segnalati 460 casi di SEU pediatrica, con un tasso di incidenza medio annuale di 0,3 casi su 100.000 abitanti (età compresa tra 0 e 15 anni). L'incidenza più alta si è sempre registrata nei bambini con età inferiore a 5 anni. Nel nostro paese, nel 70-80% dei casi la SEU è riconducibile ad un'infezione da stipi VTEC ed in particolare da VTEC O157 (39%) e da VTEC O26 (21%), mentre meno frequenti risultano le infezioni da VTEC O111, O145 e O103. L'incidenza più elevata si è registrata in comuni del nord Italia densamente abitati e a forte vocazione agricola, a dimostrazione che nell'epidemiologia della SEU i fattori legati all'ambiente e all'attività agricola sembrano giocare un ruolo determinante (55, 62, 64).

Nel corso del 2005, nell'Unione Europea, si sono registrati 3.314 casi di infezione umana da stipi VTEC, con un'incidenza di 1,2 casi/100.000 abitanti. Pur di gran lunga inferiore all'incidenza europea di altre malattie a trasmissione alimentare, quali la campilobatteriosi (51,6 casi/100.000 abitanti) e la salmonellosi

(38.2/100.000), le infezioni da VTEC rimangono estremamente temibili a causa del decorso severo e delle possibili complicanze a lungo termine (25).

I dati sull'incidenza delle infezioni da VTEC a livello europeo sono ora disponibili grazie all'applicazione della Direttiva CE 2003/99, che ha incluso le infezioni da *E. coli* produttori di verocitotossine tra le zoonosi da sottoporre a sorveglianza obbligatoria in tutti i paesi membri. Tale direttiva è stata recepita dal nostro ordinamento giuridico con il Decreto Legislativo n. 191 del 4 aprile 2006 (Attuazione della Direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici). Si auspica, pertanto, che le operazioni di sorveglianza previste dalla Direttiva 2003/99, che comprendono anche mirate indagini epidemiologiche atte a chiarire l'origine dei focolai tossinfettivi, permettano di colmare le lacune ancora esistenti e di fare luce su una zoonosi che può mettere in serio pericolo la vita umana.

BIBLIOGRAFIA

1. Armstrong G.L., Hollingsworth J., Glen Morris J. Jr. (1996). Emerging food-borne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol Rev*, 18(1): 29-51.
2. Andreoli S.P., Trachtman H., Acheson. D.W, Siegler R.L., Obrig T.G.(2002) Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Pediatr Nephrol*, 17: 293-298.
3. Batt C.A. (1999). *Escherichia coli*. In: *Enciclopedia of Food Microbiology*, Eds. Robinson R.K., Batt C.A., Patel P.P., 633-640, Academic Press, London.
4. Bettelheim K.A. (2003) Non-O157 Verotoxin-Producing *Escherichia coli*: A Problem, Paradox, and Paradigm. *Exp Biol Med* (Maywood), 228(4): 333-344.
5. Beutin L. (2000). Plasmids in VTEC: their role in virulence and their use in typing. In: *Verocytotoxinogenic Escherichia coli in Europe: Pathogenicity and Virulence. Proceedings of the 3rd Meeting of the Concerted Action FAIR6-CT98-3935*, Eds. Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y., McDowell D.A., 126-139, Castlenock, Dublin, Ireland. Teagasc, The National Food Centre.
6. Beutin L., Krause G., Zimmermann S., Kaulfuss S., Gleier K. (2004). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol*, 42: 1099-1108.
7. Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Alonso P.M., Gonzalez E.A, Bernardez M.I. (2001). Epidemiology and verocytotoxinogenic *Escherichia coli* (VTEC) in ruminants. In: *Verocytotoxinogenic Escherichia coli*, Eds. Duffy G., Garvey P., McDowell D., 113-148, Food and Nutrition Press Inc., Trumbull, Conn.
8. Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Gonzàles E.A., Bernàrdez M.I., Alonso M.P., Coira A., Rodríguez A., Rey J., Alonso J.M., Usera M.A.

- (2003). Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Exp Biol Med* (Maywood), 228(4): 345-351.
9. Boerlin P., McEven S.A., Boerlin-Petzold F., Wilson J.B., Johnson R.P., Gyles C.L. (1999). Associations between virulence factors of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol*, 37(3): 497-503.
 10. Bonardi S., Maggi E., Bottarelli A., Pacciarini M.L., Ansuini A., Vellini G., Morabito S. Caprioli A. (1999). Isolation of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from cattle at slaughter in Italy. *Vet Microbiol*, 67: 203-211.
 11. Bonardi S., Maggi E., Pizzin G., Morabito S. Caprioli A. (2001). Faecal carriage of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. *Int J Food Microbiol*, 66: 47-53.
 12. Bonardi S., Foni E., Brindani F., Bacci C., Chiapponi C., Cavallini P. (2004a). Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 and non-O157 in cattle at slaughter. *New Microbiol*, 27: 255-261.
 13. Bonardi S., Brindani F., Foni E., Morabito S. (2004b). Isolamento di *Escherichia coli* verocitotossici O157 e non-O157 da bovini macellati in Italia. In: Proceedings IV Workshop nazionale Enter-net Italia. Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche, 36, Roma, 25-26 novembre 2004.
 14. Brooks J.T., Sowers E.G., Wells J.G., Greene K.D., Griffin P.M., Hoekstra R.M., Strockbine N.A. (2005). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J Infect Dis*, 192(8): 1422-1429.
 15. Caprioli A., Luzzi I., Rosmini F., Resti C., Edefonti A., Perfumo F., Farina C., Goglio A., Gianviti A., Rizzoni G. (1994). Community wide outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, 169(1): 208-211.
 16. Chapman P.A., Siddons C.A., Wright D.J., Norman P., Fox J., Crick E. (1993). Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection in man. *Epidemiol Infect*, 111: 439-447.
 17. Chapman P.A., Siddons C.A., Cerdan-Malò A.T., Harkin M.A. (1997). A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol Infect*, 119(2): 245-250.
 18. Chapman, P.A., Cerdan-Malò A.T., Ellin M., Ashton R., Harkin M.A. (2001). *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. *Int J Food Microbiol*, 64 (1-2): 139-150.
 19. Conedera G., Marangon S., Chapman P.A., Zuin A. Caprioli A. (1997). Atypical strains of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef cattle at slaughter in Veneto region, Italy. *Zentralbl Veterinarmed B*, 44(5):

- 301-306.
20. Conedera G., Bregoli M., Iob L., Pasolli C., Bellino M., Morabito S., Bozzoli R. (2004a). Primi isolamenti di *Escherichia coli* O157 in ruminanti selvatici in Italia. In: Proceedings IV Workshop nazionale Enter-net Italia - Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche, 39, Roma, 25-26 novembre.
21. Conedera G., Dalvit P., Martini M., Galiero G., Gramaglia M., Goffredo E., Loffredo G., Morabito S., Ottaviani D., Paterlini F., Pezzotti G., Pisanu M., Semprini P., Caprioli A. (2004b). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *Int J Food Microbiol*, 96(1): 67-73.
22. Cray W.C. Jr, Moon H.W. (1995). Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*, 61: 1586-1590.
23. Decastelli L., Martorana M., Gallina S., Bottero M.T., Civera T. (2004). Prevalenza di *Escherichia coli* patogeni (VTEC, EPEC, ETEC) in prodotti lattiero-caseari. Atti XVI Convegno Nazionale AIVI, Santuario di Vicoforte (CN), 4-6 giugno, 175-180.
24. Eklund M., Scheutz F., Siitonen A. (2001). Clinical isolated of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *J. Clin. Microbiol*. 39(8): 2829-2834.
25. European Food Safety Authority (EFSA). 2006. Press release. Campylobacteriosis overtakes salmonellosis as the most reported animal infection transmitted to humans in the EU. www.efsa.europa.eu
26. Galiero G., Conedera G., Alfano D., Caprioli A. (2005a). Isolation of verocytotoxin - producing *Escherichia coli* O157 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. *Vet Rec*, 156 (12): 382-383.
27. Galiero G., Morena C., Condera G., Caprioli A. (2005b). Indagine sulla presenza di *Escherichia coli* O157 in mozzarella di bufala campana. *Industrie Alimentari*, 44: 633-634.
28. Grauke L.J., Kudva I.T., Yoon J.W., Hunt C.W., Williams C.J., Hovde C.J. (2002). Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. *Appl Environ Microbiol*, 68(5): 2269-2277.
29. Jenkins C., Pearce M.C., Smith A.W., Knight H.I., Shaw D.J., Cheasty T., Foster G., Gunn G.J., Dougan G., Smith H.R., Frankel G. (2003). Detection of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111 and O145 from bovine faeces using immunomagnetic separation and PCR/DNA probe techniques. *Lett App Microbiol*, 37(3): 207-212.
30. Jones N.L., Islur A., Haq R., Mascarenhas M., Karmali M.A., Perdue M.H., Zanke B.W., Sherman P. (2000). *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278(5): G811-G819.
31. Kang S J., Ryu S.J., Chae J.S., Eo S.K., Woo G.J., Lee J.H. (2004). Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in calves with diarrhoea. *Vet Microbiol*, 98(3-4): 323-328.

32. Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol, 2(2): 123-140.
33. Karmali M.A., Steele B.T., Petric M., Lim C. (1983). Sporadic cases of haemolytic uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet, I (8325): 619-620.
34. Konowalchuk J., Speirs J.I., Stavric S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun, 18(3): 775-779.
35. Mainil J.C., Daube G. (2005). Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? J Appl Microbiol, 98(6): 1332-1344.
36. McMaster C., Roch E.A., Willshaw G.A., Doherty A., Kinnear W., Cheasty T. (2001). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O26:H11 outbreak in a Irish creche. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 20(6): 430-432.
37. Mead P.S., Griffin, P.M. (1998). *Escherichia coli* O157:H7. Lancet, 352(9135): 1207-1212.
38. Melton-Celsa A.R., O'Brien A.D. (1998). Structure, biology and relative toxicity of Shiga Toxin members for cells and animals. In: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin producing *E. coli* strains, Eds. Kaper J.D., O'Brien A.D., 121-128, ASM Press, Washington, D.C.
39. Moake J.L., Chow T.W. (1998). Increased von Willebrand factor (vWf) binding to platelets associated with impaired vWf breakdown in thrombotic thrombocytopenic purpura. J Clin Apher, 13(3): 126-132.
40. Morabito S., Karch H., Mariani-Kurkdjian P., Schmidt H., Minelli F., Bingen E., Caprioli. A. (1998). Enteroaggregative, Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol, 36(3): 840-842.
41. Naylor S.W., Low J.C., Besser T.E., Mahajan A., Gunn G.J., Pearce M.C., McKendrick I.J., Smith D.G., Gally D.L. (2003). Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. Infect Immun, 71(3): 1505-1512.
42. Nataro J.P., Kaper J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 11(1): 142-201.
43. O'Brien A.D., LaVeck G.D., Griffin D.E., Thompson M.R. (1980). Characterization of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) toxin purified by anti-Shiga toxin affinity chromatography. Infect Immun, 30(1): 170-179.
44. O'Brien A.D., LaVeck G.D., Thompson M.R., Formal S.B. (1982). Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. J Infect Dis, 146(6): 763-769.
45. O'Brien A.D., Lively T.A., Chen M.E., Rothman S.W., Formal S.B. (1983). *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. Lancet, I (8326): 702.
46. Paton A.W., Ratcliff R.M., Doyle R.M., Seymour-Murray J., Davos D., Lanser J.A., Paton J.C. (1996). Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry-fermented sau-

- sage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol, 34 (7): 1622-1627.
47. Pearce M.C., Evans J., McKendrick I. J., Smith A.W., Knight H.I., Mellor D.J., Woolhouse M.E.J., Gunn G.J., Low J.C. (2006). Prevalence and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, and O145 shed by cattle in Scotland. Appl Environmen Microbiol, 72 (1): 653-659.
48. Picozzi C., Foschino R., Heuvelink A., Beumer R. (2005). Phenotypic and genotypic characterization of sorbitol-negative or slow-fermenting (suspected O157) *Escherichia coli* isolated from milk samples in Lombardy region. Lett Appl Microbiol, 40 (6): 491-496.
49. Remis R.S., MacDonald K.L., Riley L.W., Puhr N.D., Wells J.G., Davis B.R., Blake P.A., Cohen M.L. (1984). Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. Ann Intern Med, 101(5): 624-626.
50. Rey J., Blanco J.E., Blanco M., Mora A., Dahbi G., Alonso J.M., Hermoso M., Hermoso J., Alonso M.P., Usera M.A., Gonzalez E.A., Bernardez M.I., Blanco J. (2003). Serotypes, phage types and virulence genes of Shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. Vet Microbiol, 94(1): 47-56.
51. Rey J., Sanchez S., Blanco J.E., Hermoso de Mendoza J., Hermoso de Mendoza M., Garcia A., Gil C., Tejero N., Rubio R., Alonso J.M. (2006). Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. Int J Food Microbiol, 107(2): 212-217.
52. Rice D.H., Sheng H.Q., Wynia S.A., Hovde C.J. (2003). Rectoanal mucosal swabs culture is more sensitive than fecal culture and distinguishes *Escherichia coli* O157:H7-colonized cattle and those transiently shedding the same organism. J Clin Microbiol, 41(11): 4924-4929.
53. Riley L.W., Remis R.S., Helgersson S.D., McGee H.B., Wells J.G., Davis B.R., Hebert R.J., Olcott E.S., Johnson L.M., Hargrett N.T., Blake P.A., Cohen M.L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. New Engl J Med, 308: 681-685.
54. Rubini S., Cardeti G., Amiti S., Manna G., Onorati R., Caprioli A., Morabito S. (1999). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in sheep milk. Vet Rec, 144 (2): 56.
55. Scavia G., Tozzi A.E., Busani L., Minelli F., Procaccino M.A., Caprioli A. (2005). Sindrome emolitico uremica (SEU): studio di fattori di rischio attraverso dati di sorveglianza clinica. In: Proceedings V Workshop nazionale Enter-net Italia. Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche, 75, Istituto Superiore di Sanità, Roma, 1-2 dicembre.
56. Scheutz F., Olesen B., Engberg J., Petersen A., Molbak K., Schiellerup P., Gerner-Smidt P. (2001). Clinical features and epidemiology of infections by Verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC) from Danish patients 1997-2000, and characterisation of VTEC isolates by serotypes and virulence factors. Epidemiology of Verocytotoxigenic *E. coli* pp. 58-66. Verocytotoxigenic *E. coli* in

- Europe, Concerted Action Group CT98-3935.
57. Scheut F., Persson S., Olsen K.E.P. (2005). Association between virulence genes and the clinical manifestations in humans. In: Consensus Meeting on: Pathogenesis of verocytotoxin (VT)-producing *Escherichia coli* (VTEC) infection: defining a new paradigm for pathogenic VTEC. Istituto Superiore di Sanità, December 5th-7th, Rome.
 58. Schmidt H., Geitz C., Tarr P., Frosch M., Karch, H. (1999). Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence of clonality. *J Infect Dis*, 179 (1): 115-123.
 59. SCVPH (Scientific Committee on Veterinary Measures relating to public Health). 2003. Verotoxigenic *E. coli* (VTEC) in foodstuffs, adopted on 21-22 January 2003. (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out58_en.pdf).
 60. Tilden J. Jr., Young W., McNamara A.M., Custer C., Boesel B., Lambert-Fair M.A., Majkowski J., Vugia D., Werner S.B., Hollingsworth J., Morris J.G. Jr. (1996). A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health*, 86(8): 1142-1145.
 61. Todd W.T.A. (2001). Prospects for the prevention of haemolytic-uraemic syndrome. *Lancet*, 357(9269): 1636-1638.
 62. Tozzi A.E., Niccolini A., Caprioli A., Luzzi I., Montini G., Zacchello G., Gianviti A., Principato F., Rizzoni G. (1994). A community outbreak of haemolytic-uraemic syndrome in children occurring in a large area of northern Italy over a period of several months. *Epidemiol Infect*, 113: 209-219.
 63. Tozzi A.E., Caprioli A., Minelli F., Gianviti A., De Petris L., Edefonti A., Montini G., Ferretti A., De Palo T., Gaido M., Rizzoni, G. and the Hemolytic Uremic Syndrome Study Group (2003). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. *Em Infect Dis*, 9(1): 106-108.
 64. Tozzi A.E., Rizzoni G., Procaccino M.A., Minelli F., Marziano M.L., Scavia G., Brigotti M., Caprioli A. (2004). Sorveglianza della Sindrome Emolitico-Uremica in Italia. In: Proceedings IV Workshop nazionale Enter-net Italia - Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche, p.7, Roma, 25-26 novembre.
 65. Zschöck M., Hamann H.P., Kloppert B., Wolter W. (2000). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. *Lett Appl Microbiol*, 31(3): 203-208.

CEPPI ANTIBIOTICO-RESISTENTI DI *ENTEROCOCCUS*

ANTIBIOTIC-RESISTANT STRAINS OF *ENTEROCOCCUS*

Bianca Maria Figarolli, Maria Cristina Ossiprandi

PAROLE CHIAVE:

antibiotico-resistenza, *Enterococcus* spp., vancomicina, fattori di patogenicità.

KEY WORDS:

antibiotic-resistance, *Enterococcus* spp., vancomycin, pathogenicity factors.

Riassunto

L'antibiotico-resistenza, definita come la capacità posseduta da alcune specie batteriche di sopravvivere e moltiplicarsi in presenza di concentrazioni di antibiotico in grado di inibire o uccidere microrganismi appartenenti alla stessa specie, è considerata, ad oggi, un problema di estrema importanza nell'ambito della sanità pubblica, in quanto strettamente correlata all'inappropriato utilizzo degli antimicrobici sia in medicina umana che veterinaria (1, 2).

Le modalità con cui i microrganismi evolvono e modificano il loro genoma sviluppando antibiotico-resistenza sono varie e complesse. Alcune specie batteriche vanno incontro a mutazioni spontanee del loro corredo genetico, altre ereditano i geni codificanti per la resistenza per mezzo di plasmidi.

Questo è il caso dei batteri appartenenti al genere *Enterococcus*, microrganismi commensali associati al tratto gastroenterico di uomo e animali, dotati di specifici geni che codificano per la resistenza a svariate categorie di antibiotici quali i glicopeptidi, con particolare riferimento alla vancomicina, gli aminoglicosidi, i β -lattamici. Essendo capaci di trasferire questi geni ad altre specie batteriche, favorendo conseguentemente la diffusione del fenomeno, gli enterococchi sono stati inquadrati come patogeni emergenti responsabili, nell'uomo, di gravi infezioni soprattutto in ambito ospedaliero (3, 4).

Tra le diverse specie animali, quelle d'affezione come il cane, potrebbero svolgere un ruolo rilevante come possibili serbatoi di ceppi di *Enterococcus* antibiotico-resistenti e come eventuali vettori zoonosici.

Nell'eventualità che ciò si verifichi, risulterà necessario mettere in atto opportuni piani di monitoraggio che controllino la presenza degli enterococchi antibiotico-resistenti e la diffusione dei loro determinanti di resistenza tra animali e uomo (1, 5, 6, 7, 8).

Abstract

“Tolerance” or “antibiotic-resistance” can be defined as the ability of bacteria to grow in presence of high concentrations of antimicrobics or to withstand an antibiotic to which they were once sensitive.

This phenomenon is due to the increased use of antibiotics and helps the rapid diffusion of antimicrobial-resistant bacteria, as it happens for *Enterococcus* genus, and it consists in a progressive adaptation of bacteria as consequence of improper use of antibiotics. Furthermore this process happens faster when antibiotics are used frequently, especially at low doses over long periods of time, event which occurs when antibiotics are added to feed as growth-promoters. Antibiotic resistance develops through mutation or plasmid exchange between bacteria of the same species.

This represents an important problem in public health and in veterinary medicine. Enterococci are commensal bacteria of the intestinal microbiota both in humans or animals, but in recent years they have also emerged as important cause of nosocomial and community-acquired infections. In fact, multidrug-resistant enterococci are important pathogens responsible for nosocomial infections in humans, because they are considered *reservoirs* of genes coding for antimicrobial resistance, which can be spread to other bacterial species.

Animals, such as dogs, carrying antibiotic-resistant enterococci could also be the source of *Enterococcus* infections for humans. As a consequence, failure of antibiotic treatment may occur in human medicine.

So, it is fundamental that such effect is controlled: this problem suggests the importance of monitoring the presence of antibiotic-resistant enterococci and the circulation of their resistance determinants.

Introduzione

Gli enterococchi sono stati isolati per la prima volta da Thiercelin nel 1899 a partire da campioni fecali di origine umana e sono stati definiti, per lungo tempo, come “streptococchi fecali”. Spetta a Sherman (1937) l’osservazione della loro spiccata diversità rispetto agli altri streptococchi e la conseguente suddivisione del genere *Streptococcus* in quattro gruppi: piogeni, viridanti, lattici ed enterococchi (9). La classificazione e l’identificazione sierologica venne invece proposta da Rebecca Lancefield nel 1933 che inquadrò gli enterococchi come “streptococchi del gruppo D” (9).

Negli anni '80, il genere *Enterococcus* è stato definitivamente distinto dal genere *Streptococcus* sulla base di tecniche molecolari quali sequenziamento della subunità 16S dell’RNA ribosomiale e ibridizzazione DNA:DNA. Questo nuovo approccio tassonomico ha dimostrato come il genere *Enterococcus* risulti fortemente correlato ai generi *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus* (9, 10, 11) rispetto a quanto si verificò per i generi *Streptococcus* e *Lactococcus*. Queste stesse procedure hanno consentito di stilare una prima classificazione tassonomica del genere *Enterococcus* con la sua suddivisione in quattro gruppi (9):

- gruppo 1: *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii*
- gruppo 2: *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus*
- gruppo 3: *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*
- gruppo 4: *E. faecalis*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. saccharolyticus*

Negli anni successivi sono state identificate e classificate nuove specie, come *Enterococcus sulfureus*, isolato da piante e terreno e caratterizzato da una tipica pigmentazione giallastra ed *Enterococcus dispar*, descritto per la prima volta da Collins e collaboratori nel 1991 ed isolato a partire da materiale clinico umano (9, 12).

Il ricorso a test fenotipici, tra cui fermentazione degli zuccheri, mobilità e produzione di pigmento giallo, ha favorito l'identificazione di altre nuove specie (*E. gilvus*, *E. pallens*, *E. ratti*, *E. porcinus*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*) e la creazione di una nuova suddivisione del genere in cinque gruppi (11, 13).

L'inquadramento tassonomico del genere *Enterococcus* è tuttavia in continua evoluzione tanto che il ricorso ai tradizionali metodi di identificazione biochimica risulta spesso insufficiente (*E. faecalis* è considerata l'unica specie che può essere identificata con questi test). Si rende così necessario associarli a tecniche biomolecolari, come quelle citate in precedenza, o ad altre ancora quali elettroforesi su gel di poliacrilamide delle proteine di membrana (*SDS-PAGE of whole-cell proteins*), analisi dei polimorfismi di lunghezza delle molecole di tRNA (*tDNA-PCR: tRNA intergenic length polymorphism analysis*), analisi delle sequenze basiche del DNA (*DNA base composition*) (14, 15). Ciò ha permesso di riconsiderare la tassonomia di alcune specie di *Enterococcus* come nel caso di *Enterococcus porcinus* per il quale è stata dimostrata una stretta somiglianza genotipica e fenotipica con un'altra specie di recente identificazione, ovvero *Enterococcus villorum* (14).

Tra le più recenti nuove denominazioni rientra *Enterococcus canis* sp. nov. isolato a partire da cani affetti da otite cronica esterna per i quali ne è stata riscontrata la presenza contestualmente anche a partire da tamponi rettali. Questo ceppo è stato isolato esclusivamente nella specie canina e si differenzia dalle altre specie per il fatto di essere caratterizzato da una reazione negativa al test di Voges-Proskauer, oltre che per l'incapacità di crescere sui comuni terreni selettivi di isolamento impiegati per il genere *Enterococcus*. Inoltre la tecnica di ibridizzazione DNA-DNA ha evidenziato ulteriori differenze genotipiche consentendo di classificarlo, inopinatamente, come nuova specie (14, 15).

Sempre analizzando campioni fecali di cane, è stato isolato un gruppo di enterococchi filogeneticamente correlato ad *E. dispar* ma caratterizzato da specifiche differenze riportabili soprattutto al profilo biochimico, fatto questo che ha indotto i ricercatori ad inquadrarli come "*E. dispar-like*" (15, 16). Ulteriori e più approfonditi studi su *E. dispar* hanno consentito di caratterizzare genotipicamente questa specie, confrontandola con le altre ancora in fase di definitivo inquadramento tassonomico (specie sempre di provenienza fecale a carico del cane), e ne è emersa una forte omologia genomica fra *Enterococcus dispar*, *canis*, ed *asini*. Allo stato attuale vengono riconosciute 38 distinte specie riportate nella tabella che segue (16).

<i>aquimarinus</i>	<i>asini</i>	<i>avium</i>	<i>caccae</i>	<i>canintestini</i>
<i>canis</i>	<i>casseliflavus</i>	<i>cecorum</i>	<i>columbae</i>	<i>devriesei</i>
<i>dispar</i>	<i>durans</i>	<i>faecalis</i>	<i>faecium</i>	<i>flavescens</i>
<i>gallinarum</i>	<i>gilvus</i>	<i>haemoperoxidus</i>	<i>hermannienseis</i>	<i>hirae</i>
<i>italicus</i>	<i>malodoratus</i>	<i>moraviensis</i>	<i>mundtii</i>	<i>pallens</i>
<i>phoeniculicola</i>	<i>porcinus</i>	<i>pseudoavium</i>	<i>raffinosis</i>	<i>ratti</i>
<i>saccharolyticus</i>	<i>saccharominimus</i>	<i>seriolicida</i>	<i>silesiacus</i>	<i>solitarius</i>
<i>sulfureus</i>	<i>termitis</i>	<i>villorum</i>		

Tabella 1: Specie di *Enterococcus*

Nel cane prevalgono le specie *faecalis* e *faecium* con una frequenza di isolamento riportabile, rispettivamente a valori medi di 40 e 20%.

Facendo invece riferimento alle classiche infezioni nosocomiali da enterococco riscontrate nell'uomo, il quadro epidemiologico generale vede prevalere *Enterococcus faecalis* con una frequenza pari al 90% dei campioni clinici analizzati (sangue, urina, feci ed essudati), seguito da *Enterococcus faecium* identificato con prevalenza del 5-15% nei vari campioni testati. Le altre specie vengono di norma isolate con una frequenza inferiore al 5% (3, 11).

Inquadramento tassonomico

Gli enterococchi sono batteri gram-positivi di forma coccica, del diametro di circa 1 μ m disposti singolarmente oppure a coppie o formanti catene di lunghezza variabile, catalasi negativi, anaerobi facoltativi e immobili, ad eccezione di *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. sulfureus*. Alcune specie si presentano dotate di capsula, mentre altre risultano elaborare un particolare e caratteristico pigmento giallo (*E. casseliflavus*, *E. flavescens*). Risultano sia α - che β -emolitici se coltivati in agar sangue (terreni addizionati di sangue proveniente da pecora o bovino) con l'eccezione di *E. faecalis* che risulta talvolta privo di attività emolitica (10, 11, 17).

Sono in grado di idrolizzare l'esculina ad una temperatura di 44°C, di resistere a 60°C per 30 minuti, di crescere a temperature variabili tra 10°C e 45°C (*optimum* a T=35°C), di sviluppare a valori di pH pari a 9.6, in presenza di NaCl al 6.5%, di sali biliari al 40% come pure di blu di metilene allo 0.1%. Presentano attività fermentante nei confronti di diversi zuccheri e mostrano una spiccata attività PYRasica (11, 17, 18).

Vengono considerati microrganismi ubiquitari, essendo presenti nell'ambiente (terreno, acqua, vegetali), negli alimenti di origine animale e soprattutto nel tratto gastroenterico di animali e uomo. Nell'uomo sono stati isolati occasionalmente anche dal tratto genito-urinario come pure dalla cavità buccale (9, 10, 11).

L'isolamento degli enterococchi si effettua sia a partire da campioni di acqua, grazie al metodo della filtrazione su membrana, sia da campioni clinici (feci, urine, sangue, essudati ecc.) mediante isolamento su specifici terreni selettivi di isola-

mento (10, 11, 18). La successiva identificazione prevede il ricorso a test fenotipici e tecniche molecolari quali il sequenziamento della subunità 16S dell'RNA ribosomiale nonché metodi di tipizzazione quali PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) (10, 11).

Fattori di patogenicità

Gli enterococchi, ed in particolare *E. faecalis*, possono essere dotati di molteplici fattori di patogenicità che determinano la virulenza del genere ed intervengono direttamente ed attivamente nella genesi dell'evento infettivo: la sostanza aggregante, la proteina extracellulare di superficie, la produzione di superossido extracellulare, la citolisina, la gelatinasi, la parete cellulare, la capsula e l'antibiotico-resistenza. Quest'ultimo è senz'alcun dubbio quello maggiormente importante.

Sostanza aggregante

La sostanza aggregante, codificata dal gene *agg*, è tipica di *E. faecalis* e promuove l'adesione degli enterococchi alle superfici epiteliali, l'aggregazione tra una cellula batterica e l'altra, inducendo la formazione di ammassi dotati di una certa consistenza (17, 4, 19).

Proteina extracellulare di superficie

La proteina extracellulare di superficie (codificata dal gene *esp*) interviene nel meccanismo di adesione dei ceppi *vanB* di *E. faecalis* alla mucosa intestinale di diversi ospiti biologici (4, 19).

Superossido extracellulare

La produzione di superossido extracellulare è associata alla patogenicità dei ceppi invasivi di *E. faecium* e di *E. faecalis*. La sua funzione sembra quella di proteggere la cellula batterica dall'azione delle cellule fagocitarie (4, 17).

Citolisina

La citolisina è una citotossina ad attività emolitica che presenta notevoli analogie con le batteriocine, lisa i globuli rossi di equino e uomo, ma non quelli di bovino e pecora (questi ultimi di norma presenti nei terreni per l'isolamento selettivo). È stata riscontrata la sua presenza nel 60% dei ceppi di *E. faecalis* isolati da campioni clinici e ne è stata ampiamente confermata l'attività tossica e batteriocinica (4, 17).

Gelatinasi

La gelatinasi è una metallo-endopeptidasi extracellulare di peso molecolare pari a 30 kDa prodotta in particolare da *E. faecalis* e direttamente codificata dal gene

gelE. È stata tuttavia confermata solo una sua parziale e marginale correlazione con la virulenza del genere: in uno studio condotto da Kawalec e collaboratori è stato dimostrato come la presenza della gelatinasi regoli la produzione di una proteasi extracellulare della serina (*extracellular serine protease*), codificata dal gene *sprE* e che sembra appartenere alla famiglia delle endopeptidasi glutaminiche comuni agli stafilococchi (*extracellular serine protease e glutamyl endopeptidase I staphylococcal group*) (4, 17, 20).

Parete cellulare

I peptidoglicani e l'acido lipoteicoico, costituenti propri della parete cellulare dei microrganismi Gram-positivi, espletano la loro funzione patogena inducendo una risposta infiammatoria associata alla loro stessa interazione diretta con le cellule macrofagiche (17).

Capsula

La capsula, di natura polisaccaridica e prodotta da determinati stipiti, impedisce da un lato l'interazione del batterio con i fagociti inibendo conseguentemente l'attivazione del complemento, dall'altro consente alla superficie microbica di aumentare la propria idrofilia esprimendo un efficace contributo antimacrofagico. È opportuno sottolineare come risulti assai improbabile che la capsula venga prodotta nel momento in cui il microrganismo colonizza gli enterociti della mucosa intestinale (17).

Antibiotico-resistenza

La diffusione dell'antibiotico-resistenza è determinata dalla presenza, a livello di genoma batterico, di plasmidi e trasposoni, ovvero piccole porzioni di genoma capaci, nel primo caso di replicare autonomamente, nel secondo di muoversi ed inserirsi in punti diversi dello stesso organismo.

I trasposoni, diversamente dai plasmidi, possono esistere solo come strutture inserite nel genoma, cromosomiale o plasmidico. La loro presenza, infatti, è stata rilevata nel cromosoma batterico e nel cosiddetto "fattore R", un particolare plasmide che contiene contestualmente sia i geni che codificano per l'antibiotico-resistenza sia i geni che codificano per l'attitudine all'attività coniugativa, cioè al trasferimento del plasmide stesso da un ceppo batterico ad un altro (21, 22).

La resistenza antibiotica multipla plasmidica e trasposone mediata viene acquisita dagli enterococchi con diversi meccanismi di coniugazione e si può manifestare nei confronti di tetracicline, eritromicina, cloramfenicolo, di elevate concentrazioni di aminoglicosidi, β -lattamici, del complesso quinopristina-dalfopristina e dei glicopeptidi, in particolare verso la vancomicina.

L'antibiotico-resistenza può essere anche intrinseca e manifestarsi nei confronti di basse concentrazioni di aminoglicosidi (gentamicina e streptomina), β -lattamici e glicopeptidi (vancomicina e teicoplanina) (4).

Nella Tabella 2 sono riassunti i fattori di patogenicità degli enterococchi.

FATTORI DI PATOGENICITÀ	PROPRIETÀ
Sostanza aggregante (<i>agg</i>)	adesione agli epiteli (<i>E. faecalis</i>)
Proteina extracellulare di superficie (<i>esp</i>)	adesione agli epiteli (<i>E. faecalis</i>)
Superossido extracellulare	attività antifagocitaria (<i>E. faecalis</i>)
Capsula	attività antifagocitaria (<i>E. faecalis</i>)
Citolisina	attività emolitica (<i>E. faecalis</i>)
Parete cellulare	Induzione della risposta infiammatoria (<i>E. faecalis</i>)
Gelatinasi (<i>gelE</i>)	<i>E. faecalis</i>
ANTIBIOTICO-RESISTENZA	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>

Tabella 2: Fattori di patogenicità degli enterococchiResistenza agli antibiotici glicopeptidi

Gli antibiotici glicopeptidici vengono impiegati nel trattamento delle infezioni nosocomiali sostenute da batteri Gram-positivi, inclusi i generi *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Clostridium*. Comprendono principalmente teicoplanina e vancomicina; quest'ultima, da un punto di vista clinico, rappresenta il principio attivo più rilevante. La vancomicina è stata scoperta negli anni '50 come metabolita secondario prodotto da *Streptomyces orientalis* (riclassificato con il nome di *Amycolatopsis orientalis*), un microrganismo ad habitat terricolo. Grazie alla sua notevole efficacia in fase di trattamento delle classiche infezioni sostenute da Gram-positivi, che non rispondevano ad altri protocolli terapeutici, la vancomicina è stata rapidamente riconosciuta come antibiotico di prima scelta. Il suo impiego è stato limitato in seguito agli effetti tossici osservati in alcune circostanze e riportabili alla somministrazione di preparazioni antibiotiche non omogenee e, in tali situazioni cliniche, è stato sostituito da un antibiotico β -lattamico di terza generazione, la meticcillina, dimostratasi attiva nei confronti di microrganismi resistenti alle penicilline. Il conseguente e facilmente ipotizzabile eccessivo utilizzo della meticcillina ha tuttavia indotto lo sviluppo di ceppi batterici resistenti, in particolare nei confronti di *Staphylococcus aureus* (MRSA: *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), fatto questo che ha favorito l'inevitabile ripristino terapeutico della vancomicina. Negli anni '80, comunque, lo stesso fenomeno verificatosi per la meticcillina si ripropose anche per la vancomicina, con l'insorgenza del fenomeno della resistenza. Lo sviluppo della resistenza alla vancomicina ha creato non pochi problemi nella scelta dei protocolli terapeutici dal momento che questo antibiotico è considerato, ad oggi, l'unico ancora efficace nel trattamento delle infezioni enterococciche nell'uomo. Ne è inevitabilmente conseguito un forte incremento delle attività di ricerca mirate ad individuare nuovi agenti antibatterici, approfondendo contestualmente le conoscenze relative agli intrinseci meccanismi molecolari che stanno alla base del fenomeno (3, 23, 24).

La resistenza ai glicopeptidi negli enterococchi si manifesta grazie alla presenza, nel genoma batterico, di sei distinti geni indicati con la sigla *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, codificanti per i rispettivi pattern fenotipici.

vanA: codifica per un alto livello di resistenza alla vancomicina. Si tratta del primo fenotipo ad essere stato studiato e si presenta localizzato sul trasposone Tn1546 di *Enterococcus faecium*. Questo trasposone è spesso posizionato a livello plasmidico e ciò consente il suo trasferimento, mediante coniugazione, ad altri enterococchi e talvolta anche ad altre specie batteriche, tra cui *Streptococcus pneumoniae* resistente alle cefalosporine di terza generazione, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus lactis*, *Staphylococcus aureus* meticillina-resistente, *Listeria* (3, 23, 24).

vanB: codifica per un moderato livello di resistenza alla vancomicina dimostrando invece una netta sensibilità nei confronti della teicoplanina. *vanB* è stato isolato prevalentemente da *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus faecalis*. Il gene si trova spesso localizzato sul cromosoma batterico e, di conseguenza, non può essere trasferito ad altri microrganismi. Raramente si posiziona su elementi genetici mobili, come i plasmidi o il trasposone Tn1549, quest'ultimo di più difficile identificazione (3, 23, 24). Tuttavia è stata di recente dimostrata, mediante PCR, la presenza di *vanB* in 6 diversi ceppi di microrganismi bacillari Gram-positivi anaerobi appartenenti ai generi *Clostridium* e *Ruminococcus*, isolati da campioni di feci di pazienti ospedalizzati che erano risultati negativi agli enterococchi vancomicina-resistenti. Questo riscontro atipico ha portato a risultati falsi positivi alla lettura della PCR (25).

vanC: codifica per bassi livelli di resistenza intrinseca alla vancomicina (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. flavescens*) (3, 23, 24).

vanD: codifica per la resistenza alla vancomicina e alla teicoplanina (*E. faecium*), sembra essere localizzato su un cromosoma e non trasferibile da un enterococco all'altro (3, 23, 24).

vanE* e *vanG: scoperti recentemente, codificano per bassi livelli di resistenza alla vancomicina e mostrano spiccata sensibilità alla teicoplanina (*E. faecalis*) presentando analogie con il fenotipo VanC (3, 23, 24).

In sintesi è possibile asserire che la sostituzione dei normali precursori dei peptidoglicani a sequenza terminale D-ala-D-ala, con precursori modificati terminanti con la sequenza D-alanina-D-lattato (*D-ala-D-lac*) per i fenotipi VanA, VanB, VanD e con la sequenza D-alanina-D-serina per i fenotipi VanC, VanE, VanG, corrisponde al meccanismo di base responsabile della resistenza ai glicopeptidi.

Resistenza agli antibiotici aminoglicosidi

Recenti studi hanno dimostrato l'esistenza di due livelli di resistenza nei

confronti degli antibiotici aminoglicosidi: moderati livelli di resistenza, con valori di MIC pari a 62-500 µg/ml, ed elevati livelli di resistenza (HLR: *high-level resistance*) caratterizzati da valori di MIC ≥ 2000 µg/ml e riconducibili alla produzione di enzimi in grado di inattivare gli aminoglicosidi stessi. La resistenza che gli enterococchi mostrano nei confronti degli aminoglicosidi si manifesta con meccanismi diversi. La resistenza alla gentamicina e ad altri aminoglicosidi (amikacina, kanamicina, tobramicina e netilmicina) deriva dalla presenza dell'enzima 2''-fosfotransferasi-6'-acetiltransferasi (ACC(6')-I/APH(2'')-I), codificato dal gene *aac(6')-aph(2'')*. Alcuni studi hanno inoltre confermato l'esistenza di diversi plasmidi implicati nella trasmissione della resistenza alla gentamicina, per esempio, il frammento Tn924. La resistenza alla streptomycinina, invece, è stata osservata soprattutto nei ceppi di *Enterococcus* produttori dell'enzima streptomycinina-adeniltransferasi e può risultare anche di origine ribosomiale, in seguito ad una specifica mutazione che rende i ribosomi resistenti all'azione inibitoria della streptomycinina. Infine la resistenza alla kanamicina è determinata dalla produzione dell'enzima 3'-fosfotransferasi (APH(3')-III), codificato dal gene *aph(3')-IIIa*, che esplica la sua funzione eliminando il sinergismo tra gli agenti attivi sulla parete cellulare e l'amikacina ed agisce fosforilando il gruppo idrossilico in posizione 3'. I risultati di alcune ricerche hanno rilevato un maggior livello di resistenza alla gentamicina, streptomycinina e kanamicina in stipti di *Enterococcus faecalis* rispetto a quanto si riscontri in ceppi riportabili ad *Enterococcus faecium* (3, 23).

Resistenza agli antibiotici β -lattamici

La resistenza intrinseca nei confronti degli antibiotici β -lattamici costituisce un carattere tipico del genere *Enterococcus*. Gli enterococchi vengono distinti in due categorie: produttori di penicillasi e non produttori di penicillasi. Tra questi ultimi, *E. faecium* presenta elevati livelli di resistenza nei confronti della penicillina e dell'ampicillina: è necessaria infatti una concentrazione pari o maggiore a 16-64 µg/ml per inibirne la crescita, contrariamente a quanto si verifica nel caso di *E. faecalis* la cui crescita è inibita da una concentrazione molto più ridotta degli stessi antibiotici (1-10 µg/ml). Il meccanismo alla base della resistenza alle penicilline è rappresentato dalla produzione di particolari enzimi localizzati a livello di parete cellulare coinvolti nella crescita e nella divisione delle cellule batteriche, ovvero le proteine a bassa affinità leganti le penicilline (*low-affinity* PBP: *penicillin-binding proteins*). Il meccanismo con cui si sviluppa la resistenza non è stato ancora definitivamente chiarito, pur venendo associato ad una carenza di autolisina. Gli antibiotici β -lattamici, che legano le PBP, inattivano le autolisine batteriche responsabili della distruzione dei legami covalenti presenti nella parete cellulare batterica e scatenano batteriolisi. Nell'ambito degli enterococchi produttori di penicillasi, *Enterococcus faecalis* rappresenta il ceppo isolato più frequentemente. La penicillasi enterococcica è codificata dal gene *aph(2'')-Ia/aac(6')-Ie* a localizzazione plasmidica e si manifesta, in particolare, nei ceppi che esibiscono elevati livelli di resistenza nei confronti della gentamicina (2, 3, 23).

Resistenza alla streptogramina

Le streptogramine rientrano in un gruppo di antibiotici naturali prodotti da ceppi di *Streptomyces* e sono caratterizzati da una struttura chimica e da un meccanismo d'azione del tutto simili a quelli propri di macrolidi e lincosamidi.

Trovano impiego nel trattamento delle infezioni sostenute da stipiti riportabili ad *Enterococcus faecium*. Il complesso quinopristina-dalfopristina costituisce una miscela idrosolubile che deriva dall'associazione di due streptogramine: la streptogramina A (dalfopristina) e la streptogramina B (quinopristina). Queste molecole agiscono legando i ribosomi batterici ed inibendo la sintesi proteica con un meccanismo del tutto irreversibile. Mediante tecniche di biologia molecolare, riportabili a PCR e PFGE, è stato possibile individuare i geni presenti nel DNA degli enterococchi coinvolti nel determinismo della resistenza verso questa famiglia di antibiotici. Tra le diverse specie di *Enterococcus*, quelle di maggior interesse sono risultate *faecium* e *faecalis*. *Enterococcus faecalis* ha dimostrato di possedere resistenza intrinseca nei confronti del complesso quinopristina-dalfopristina, mentre *Enterococcus faecium* diviene resistente acquisendo attivamente i geni che codificano per questo carattere (17, 20).

Nella seguente Tabella (Tabella 3) sono invece riassunte le caratteristiche di antibiotico resistenza negli enterococchi

RESISTENZA INTRINSECA	RESISTENZA ACQUISITA
β -lattamici (in particolare: penicilline penicillasi-resistenti e cefalosporine)	Elevate concentrazioni di β -lattamici, per alterazione delle PBP o per produzione di β -lattamasi
Basse concentrazioni di aminoglicosidi	Elevate concentrazioni di aminoglicosidi
Clindamicina	Glicopeptidi (vancomicina e teicoplanina)
Fluorochinoloni	Tetraciclina
	Eritromicina
	Fluorochinoloni
	Rifampicina
	Cloramfenicolo
	Acido fusidico
	Nitrofurantoina

Tabella 3: Resistenza agli antibiotici negli enterococchi (3)

Epidemiologia

La conseguenza inevitabile dell'utilizzo inappropriato e talvolta scorretto degli antibiotici, sia in medicina umana che veterinaria, è rappresentata dallo svi-

luppo e dalla diffusione di microrganismi resistenti, commensali e patogeni, tra cui quelli appartenenti proprio al genere *Enterococcus* (28).

Da quanto riportato in bibliografia relativamente alla diffusione di questi batteri, è possibile operare una netta distinzione tra la situazione rilevabile in Europa e quella riportabile negli Stati Uniti.

In Europa, infatti, il problema può essere inquadrato nell'ambito strettamente zootecnico nel quale gli antibiotici vengono frequentemente addizionati alla razione allo scopo di promuovere la crescita degli animali. Molte di queste sostanze sono analoghe agli antibiotici comunemente impiegati nei protocolli terapeutici ed esplicano la loro azione a livello intestinale, modificandone la flora microbica. Un esempio è dato dall'avoparcina, un glicopeptide simile alla vancomicina, impiegato a lungo come promotore di crescita nell'alimentazione di varie specie da reddito quali bovini, suini e specie avicole, ed in seguito bandito dall'Unione Europea per aver favorito la selezione dei ceppi di enterococco glicopeptidi-resistenti, come documentato da diversi studi condotti in diversi Paesi Europei, tra cui anche l'Italia. È stato inoltre osservato come, in seguito al ritiro dell'avoparcina, la colonizzazione intestinale da parte di ceppi di enterococco vancomicina-resistenti sia diminuita in maniera significativa, in particolar modo nella specie avicole (4, 28, 29, 30).

Negli Stati Uniti, invece, il problema interessa principalmente l'ambito ospedaliero e deriva dall'impiego scorretto/inappropriato nei differenti protocolli terapeutici di antibiotici quali cefalosporine di terza generazione e vancomicina (4, 31). Tuttavia entrambe queste situazioni hanno portato in modo del tutto simile allo sviluppo di ceppi resistenti, con particolare riferimento a quelli vancomicina-resistenti (VRE: *vancomycin-resistant enterococci*). Questi ceppi particolarmente virulenti sono stati isolati per la prima volta in Europa nel 1986 e, immediatamente dopo, è stato descritto il primo caso clinico a St. Louis negli Stati Uniti. In precedenza la presenza di VRE non era mai stata adeguatamente monitorata perché gli enterococchi non venivano inquadrati come possibili patogeni (4, 30, 31).

Gli animali da reddito sono considerati i principali serbatoi (*reservoir*) di enterococchi antibiotico-resistenti, venendo questi ultimi disseminati attraverso l'escrezione fecale ed operando una susseguente massiva contaminazione ambientale. Il ciclo epidemiologico prevede che l'uomo possa preferenzialmente contrarre infezione per semplice contatto diretto, tuttavia un'altra possibile via di trasmissione è riconducibile ad alimenti di origine animale precedentemente contaminati. Questa identica eventualità eziopatogenetica può interessare anche gli animali da compagnia ed in particolare il cane, che può acquisire questi ceppi con le stesse modalità indicate per l'uomo (4, 6, 28, 32).

In ambito strettamente ospedaliero, invece, i soggetti più a rischio risultano i pazienti immunodepressi ricoverati presso le unità di terapia intensiva lungodegenti e sottoposti per lunghi periodi a terapia antibiotica ad ampio spettro. Questi possono contrarre infezione in seguito a interventi chirurgici particolarmente invasivi, come pure per contatto con pazienti precedentemente infetti, portatori presenti nell'ambito del personale ospedaliero, strumentazione e superfici contaminate. In tali casi le conseguenze sono particolarmente gravi e riportabili ad episodi di endocardite, infezioni del tratto genito-urinario, batteriemia ed endoftalmite (3, 4).

Il cane come possibile serbatoio

Il tratto gastroenterico del cane, così come quello di molti altri mammiferi tra cui l'uomo, risulta colonizzato da diverse specie batteriche, comprese quelle appartenenti al genere *Enterococcus* (*E. faecalis* pare sia la specie predominante a livello fecale). La presenza di questa microflora risulta vantaggiosa all'animale, in quanto permette di prevenire potenziali infezioni sostenute da microrganismi dotati di una più spiccata invasività e patogenicità. Tuttavia, l'intestino rappresenta anche un ambiente ottimale di crescita per ceppi batterici a spiccata virulenza che possono costituire un grave e consistente pericolo per la salute dell'animale. Tra questi anche gli enterococchi che, pur essendo filogeneticamente inquadrabili come batteri commensali dell'intestino ed in genere apatogeni, in particolari condizioni possono determinare l'insorgere di severi quadri morbosì. La patogenicità è, tra l'altro, determinata dalla presenza di particolari geni che codificano per lo specifico carattere dell'antibiotico-resistenza (1, 5, 15).

Già dal secolo scorso, il fenomeno dell'antibiotico-resistenza e la diffusione degli enterococchi antibiotico-resistenti sono diventati una realtà a livello sanitario sia in medicina umana che veterinaria, tanto da essere considerati un problema emergente di sanità pubblica a livello mondiale. Inoltre questi microrganismi presentano la proprietà di acquisire e trasferire facilmente i geni codificanti per questo carattere anche ad altre specie batteriche, in particolare *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* spp., *Lactobacillus lactis* e *Streptococcus* spp. (1, 7, 9). Tuttavia gli studi effettuati con lo scopo di analizzare il problema, confinando l'attenzione a livello di animali da compagnia, risultano poco approfonditi. Sarebbe quindi necessario acquisire maggiori conoscenze in materia di antibiotico-resistenza, dal momento che gli animali da affezione, vivendo a stretto contatto con i loro proprietari, diventano potenziali vettori nella trasmissione di eventuali ceppi batterici resistenti. Gli stessi possono pertanto facilmente diffondere attraverso le deiezioni anche nell'ambiente circostante, coinvolgendo di conseguenza l'uomo (5). Il primo caso di infezione da enterococco vancomicina-resistente nel cane è stato documentato in Gran Bretagna nei primi anni '90. Gli studi successivi hanno poi dimostrato come questo fenomeno non fosse così raro ed hanno confermato come il ceppo isolato con maggior frequenza fosse *E. faecium* tipo *vanA*. È possibile che la trasmissione sia avvenuta attraverso alimenti a base di carne, derivati da animali trattati con avoparcina o contaminati con materiale fecale (6, 32). Nonostante gli studi epidemiologici inerenti gli enterococchi antibiotico-resistenti debbano essere considerati insufficienti, la maggior parte della documentazione che riporta la loro presenza in animali da compagnia fa riferimento ai cani "d'azienda", che vivono a diretto e stretto contatto con altre specie animali per le quali la presenza di questi specifici stipiti viene riscontrata più frequentemente (6, 7). Seppur in minor misura vi sono dei dati riferiti alla presenza di ceppi vancomicina-resistenti (VRE) isolati da cani che vivono in aree urbane: non si conosce tuttavia la modalità attraverso la quale sia avvenuta la trasmissione, in quanto questi cani non sono stati a contatto con le specie da reddito e non si sono neppure sottoposti in precedenza ad uno specifico trattamento antibiotico con vancomicina (7). Tuttavia,

da uno studio eseguito a Madrid nel 2004, il dato più rilevante emerso è che il 13% dei cani esaminati albergano ceppi di *E. faecium* vancomicina-resistenti nelle feci e che molti di questi risultano resistenti anche ad altri antibiotici normalmente utilizzati nella pratica veterinaria. A partire da tale dato si evince che i cani abitanti nelle aree urbane potrebbero essere considerati un significativo *reservoir* di *E. faecium* resistenti a molteplici fattori antimicrobici (7). Inoltre, dal momento che è stata dimostrata la trasmissione diretta di enterococchi dagli animali da reddito all'uomo, si può aggiungere che anche il cane potrebbe rappresentare un'importante fonte di ceppi VRE. La facile ed efficace contaminazione per semplice contatto diretto con le feci potrebbe contribuire alla trasmissione orizzontale di quei geni specifici che codificano per la resistenza tra stipiti di enterococco animali ed umani. A conferma di ciò in un recente studio americano è stata descritta la netta somiglianza tra il trasposone Tn1546 appartenente a ceppi di *E. faecalis* vancomicina-resistenti isolati da campioni di urine di cani ed il trasposone Tn1546 proprio di ceppi di *E. faecalis* vancomicina-resistenti isolati da campioni clinici umani. Questo importante dato epidemiologico potrebbe sostenere la tesi secondo la quale lo scambio tra determinanti di resistenza tra enterococchi di origine canina e umana sia effettivamente possibile (33). Infatti, nonostante i risultati di svariati studi di tipizzazione bio-molecolare possano suggerire che gli enterococchi si comportino come agenti ospite-specifico o ospite adattato, queste rilevazioni non precludono un possibile trasferimento animale-uomo del carattere antibiotico-resistenza. Di fatto, essendo gli enterococchi di derivazione animale facilmente reperibili in alimenti di origine animale e di conseguenza agevolmente ingeriti dall'uomo, gli stipiti di *Enterococcus* animali probabilmente contribuiscono, grazie ad opportuni geni di resistenza e ad altri fattori di patogenicità, all'incremento della sopravvivenza degli stessi nell'ospite uomo. Il rinvenimento di specifici cloni isolati a partire da infezioni nosocomiali non preclude, infatti, che enterococchi provenienti da serbatoi animali contribuiscano a favorire queste stesse varianti clonali. È assai probabile che si verifichi l'ingresso in ambiente ospedaliero di enterococchi provenienti da altri *reservoir* (ad esempio nuovi pazienti oppure alimenti di origine animale contaminati). Questi dati dimostrano l'urgenza e la necessità di un attento monitoraggio circa la presenza degli enterococchi antibiotico-resistenti e l'esigenza di un controllo continuo della diffusione dei determinanti di resistenza negli animali da compagnia in generale, e nel cane in particolare, come elemento sostanziale nel programma di sorveglianza dei ceppi VRE.

CONCLUSIONI

Lo scopo di questa raccolta di dati è stato quello di approfondire le conoscenze sul genere *Enterococcus*, al fine di analizzare il fenomeno dell'antibiotico-resistenza, il cui sviluppo è considerato universalmente correlato allo "scorretto" utilizzo degli antibiotici, sia in ambito veterinario che in quello proprio della medicina umana. Se da un lato è ormai riconosciuta una diretta correlazione tra utilizzo di antimicrobici e prevalenza del fenomeno resistenza prevalentemente in ambito zootecnico, il problema dello sviluppo e della diffusione del fenomeno negli animali da compagnia e le possibili conseguenti ripercussioni sull'uomo non sono ancora state

completamente analizzate ed approfondite. È necessario quindi studiare più attentamente il problema, per capire se gli animali da compagnia possano essere definiti come veri e propri possibili serbatoi di microrganismi patogeni anche per l'uomo e, nell'eventualità, dimostrare se siano o meno in grado di trasferire i loro caratteri di resistenza, comportando un possibile grave rischio sanitario (1, 8). Ne deriva l'urgenza di creare un'attiva e fitta rete di sorveglianza mirata a monitorare principalmente gli enterococchi antibiotico-resistenti, valutandone la distribuzione geografica e seguendo l'evoluzione dinamica, soprattutto in termini di variabilità genica di quei fattori codificanti per questo carattere, sia nella popolazione animale e umana che a livello ambientale. Questa logica appare fondamentale in una più ampia visione che conduca a rivalutare positivamente la profilassi antibiotica come utile ed essenziale strumento di tutela della salute pubblica.

RINGRAZIAMENTI

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

BIBLIOGRAFIA

1. Rodrigues J., Poeta P., Martins A., Costa D. (2002). The importance of pets as reservoir of resistant *Enterococcus* strains, with special reference to vancomycin. J. Vet. Med, B 49: 278-280.
2. Saribas S., Bagdatli Y. (2004). Vancomycin tolerance in enterococci. Chemother., 50: 250-254.
3. Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.G. (2000). Vancomycin-resistant enterococci. Clin. Microb. Rev.: 686-707.
4. Mundy L.M., Sahm D.F., Gilmore M. (2000). Relationship between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Focus, Clin. Microb. Rev.: 513-522.
5. De Graef E.M., Decostere A., Devriese L.A., Haesebrouck F. (2004). Antibiotic resistance among fecal indicator bacteria from healthy individually owned and kennel dogs. Microb. Drug Resist., 10(1): 65-69.
6. Devriese L.A., Ieven M., Goossens H., Vandamme P., Pot B., Hommez J., Haesebrouck F. (1996). Presence of vancomycin-resistant enterococci in farm and pet animals. Antimicrob. Agents Chemother.: 2285-2287.
7. Herrero I.A., Fernández-Garayzábal J.F., Moreno M.A., Domínguez L. (2004). Dogs Should Be Included in Surveillance Programs for Vancomycin-Resistant Enterococci. J. Clin. Microbiol., 42(3): 1384-1385.
8. Prescott J.F., Hanna W.J.B., Reid-Smith R., Drost K. (2002). Antimicrobial drug use and resistance in dogs. Can. Vet. J., 43: 107-116.
9. Leclerc H., Devriese L.A., Mossel D.A.A. (1996). Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicator of faecal contamination in drinking water. J. Appl. Bacteriol., 81: 459-466.

10. Manero A., Blanch A.R.(1999). Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. Appl. Envir. Microb.: 4425-4430.
11. Teixeira L.M., Facklam R.R. (2003). *Enterococcus*. In: Manual of Clinical Microbiology, 1, Ed. Murray P.R., Tenover J.C., Tenover B.C., Tarran P., Tenover M.A., Tenover K.H., 8th ed., 422-433, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Collins M.D., Rodrigues U.M., Pigott N.E., Facklam R.R. (1991). *Enterococcus dispar* sp nov. a new *Enterococcus* species from human sources. Lett Appl. Microb., 12: 95-98.
13. Svec P., Devriese L.A., Sedlacek I., Baele M., Vancanneyt M., Haesebrouck F., Swing J., Doskar J. (2001). *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov. isolated from water. Int. J. Syst. Evol. Microb., 51: 1567-1574.
14. De Gaef E.M., Devriese L.A., Vancanneyt M., Baele M., Collins M.D., Lefebvre K., Swings J., Haesebrouck F. (2003). Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al. 2001. Int. J. Sys. Evol. Microb., 53: 1069-1074.
15. De Graef E.M., Devriese L.A., Baele M., Vancanneyt M., Swings J., Haesebrouck F., Decostere A. (2005). Identification of enterococcal, streptococcal and *Weissella* species in the faecal flora of individually owned dogs. J. Appl. Microb., 99(2):348-353.
16. Naser S.M., Vancanneyt M., De Graef E., Devriese L.A., Snauwaert C., Lefebvre K., Hoste B., Svec P., Decostere A., Haesebrouck F., Swings J. (2005). *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. Int. J. Syst. Evol. Microb., 55(5): 2177-2182.
17. Hirsh D.C., Biberstein E.L. (2004). *Streptococcus* and *Enterococcus*. In: Veterinary Microbiology, Ed. Hirsh D.C., MacLachlan N.J., Walker R.L., 2nd ed.: 165-167, Blackwell Publishing, CA.
18. Istituto Superiore di Sanità, Reparto di Igiene delle Acque Interne (2003). Determinazione degli Enterococchi.
19. Laukova A., Strompfova V., Ouwehand A. (2004) Adhesion properties of enterococci to intestinal mucus of different hosts. Vet. Res. Comm., 28(8): 647-655.
20. Kawalec M., Potempa J., Moon J.L., Travis J., Murray B.E. (2005). Molecular diversity of a putative virulence factor: purification and characterization of isoforms of an extracellular serine glutamyl endopeptidase of *Enterococcus faecalis* with different enzymatic activities. J. Bacteriol.: 266-275.
21. Poli G. (2002). Morfologia, struttura e funzione della cellula batterica. In: Microbiologia medica, Ed. Poli G., Cocuzza G., Nicoletti G., Clementi M., 2nd ed.: 77-78.
22. Poli G. (2002). Genetica dei microrganismi. In: Microbiologia medica, Ed. Poli G., Cocuzza G., Nicoletti G., Clementi M., 2nd ed.: 144-147.
23. Murray B.E., Tenover M.D. (1998). Diversity among multidrug-resistant enterococci. Synopses, Emerg. Infect. Dis., 4(1): 37-47.

24. Pootoolal J., Neu J., Wright G.D. (2002). Glycopeptide antibiotic resistance. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 42: 381-408.
25. Ballard S.A., Grabsch E.A., Johnson P.D.R., Grayson M.L. (2005). Comparison of three PCR primer sets for identification of vanB gene carriage in feces and correlation with carriage of vancomycin-resistant enterococci: interference by vanB-containing anaerobic bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.*: 77-81.
26. Hayes J.R., Wagner D.D., English L.L., Carr L.E., Joseph S.W. (2005). Distribution of streptogramin resistance determinants among *Enterococcus faecium* from a poultry production environment of the USA. *J. Antimicrob. Chemother.*, 55: 123-126.
27. Hershberger E., Oprea S.F., Donabedian S.M., Perri M., Bozigar P., Bartlett P., Zervos M.J. (2005). Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *J. Antimicrob Chemother.*, 55: 127-130.
28. Van den Bogaard A.E., Stobberingh E.E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 14(4):327-335.
29. Del Grosso M., Caprioli A., Chinzari P., Fontana M.C., Pezzotti G., Manfrin A., Di Giannatale E., Goffredo E., Pantosti A. (2000). Detection and characterization of vancomycin-resistant enterococci in farm animals and raw meat products in Italy. *Microb. Drug Resist.*, 6(4): 313-318.
30. Wegener H.C., Aarestrup F.M., Jensen L.B., Hammerum A.M., Bager F. (1999). Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Perspectives, Emerg. Infect. Dis.*, 5(3): 329-335.
31. Treitman A.N., Yarnold P.R., Warren J., Noskin G.A. (2005). Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2003). *J. Clin. Microb.*, 43(1): 462-463.
32. Heuer O.E., Hammerum A.M., Collignon P., Wegener H.C. (2006). Human health hazard from antimicrobial-resistant enterococci in animals and food. *Food Safety*, 43: 911-916.
33. Simjee S., White D.G., McDermott P.F., Wagner D.D., Zervos M.J., Donabedian S.M., English L.L., Hayes J.R., Walker R.D. (2002). Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci. *J. Clin. Microb.*, 40(12): 4659-4665.

BATTERIOCINE: EVOLUZIONE, ECOLOGIA ED APPLICAZIONI PRATICHE

BACTERIOCINS: EVOLUTION, ECOLOGY AND PRACTICE APPLICATION

Valeria Raffi, Maria Cristina Ossiprandi

PAROLE CHIAVE:

batteriocina, proteina, attività antimicrobica, bioconservante, probiotico.

KEY WORDS:

bacteriocin, protein, antimicrobial activity, bio-preservative, probiotic.

Riassunto

I microrganismi, per loro stessa natura, sono in grado di attivare una serie di sistemi difensivi estremamente varia.

Tra questi sistemi rientrano i classici antibiotici, svariati agenti litici, diversi prodotti del metabolismo batterico, varie tipologie di esotossine, e le batteriocine.

Lo scopo di questo articolo è quello di fornire un quadro sufficientemente ampio e dettagliato per quanto concerne uno dei sistemi difensivi più consistenti e diversificati del mondo batterico: le batteriocine.

Verranno affrontate le caratteristiche generali di queste straordinarie proteine con un'attenzione particolare alle batteriocine prodotte da batteri lattici analizzandone, nel dettaglio, la genetica e la regolazione della loro produzione, il meccanismo d'azione ed il ruolo ecologico che queste sostanze svolgono all'interno di una popolazione batterica.

In seguito l'attenzione verrà focalizzata sul ruolo svolto dalle batteriocine in campo clinico e sulla salute umana, delineando un loro possibile e proficuo utilizzo in qualità di bioconservanti alimentari.

Verranno inoltre riportati i dati sperimentali relativi all'attività della colicina V+, batteriocina prodotta da *E. coli*, con la finalità di stimarne la sua azione specifica nei confronti di diversi stipiti batterici sia Gram positivi che Gram negativi.

Abstract

Microbes produce an extraordinary array of microbial defence systems.

Sezione di Microbiologia ed Immunologia Veterinaria Dipartimento Salute Animale
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Parma
Via del Taglio n° 8 - 43100 Parma - Tel. 0521/032718
maria.cristina.ossiprandi@unipr.it

These include classical antibiotics, lytic agents, metabolic by-products, several different types of protein exotoxins, and bacteriocins.

The purpose of this article is to review current knowledge about one of the most abundant and diverse family of microbial defence systems: the bacteriocins.

First of all, we discuss the general characteristics of these extraordinary proteins, in particular bacteriocins produced by lactic acid bacteria, the genetics and regulation of their production, their mode of action and ecological role (mediating bacterial population-level and controlling community-level dynamics).

In the latter half of this article we focus on the potential possible role played by bacteriocins in biomedical and human health field, with particular reference to the current role in food preservation.

It's also reported results concerning activity of colicin V+, bacteriocin produced by *Escherichia coli*, to estimate its specific action against various Gram positive and negative strains.

Introduzione

Col termine “batteriocine”, coniato nel 1953 da Jacob e collaboratori, vengono indicate quelle molecole proteiche di produzione batterica generate indifferentemente da Gram-positivi e da Gram-negativi e dotate di attività inibitoria nei confronti di ceppi batterici diversi dal ceppo produttore, ma a questo strettamente correlati.

La famiglia delle batteriocine comprende un'ampia gamma di proteine che si differenziano in termini di dimensioni, struttura chimica, cellule *target*, modalità d'azione e meccanismi immunitari indotti, e che si ritiene vengano prodotte dal 99% delle specie batteriche presenti in natura.

Le batteriocine prodotte dai batteri Gram negativi sono generalmente proteine ad elevato peso molecolare che presentano un caratteristico dominio, specifico per l'adesione, la traslocazione o l'attività di *killing* della batteriocina stessa, mentre le batteriocine prodotte dai batteri Gram positivi sono generalmente peptidi cationici, di piccole dimensioni e termostabili, inizialmente sintetizzati come pre-peptidi e che, in seguito a fenomeni di scissione, si trasformano nelle molecole biologicamente attive.

Genetica

L'informazione genetica che codifica per la produzione di batteriocine può essere contenuta sia a livello plasmidico, sia a livello cromosomico e tale produzione può avvenire spontaneamente oppure conseguire ad una stimolazione operata da agenti ambientali, fisici o chimici.

I geni che codificano per le batteriocine prodotte dai batteri Gram negativi risultano localizzati a livello plasmidico, mentre i geni che codificano per le batteriocine prodotte dai Gram positivi possono essere presenti sia a livello plasmidico che cromosomico, ed inoltre si localizzano specificamente in strutture multigene operone-simili; il corredo genetico deputato alla produzione delle batteriocine ad opera dei Gram positivi risulta anche estremamente più ampio rispetto a quello dei Gram negativi.

Meccanismo d'azione

Le batteriocine prodotte dai batteri Gram negativi si differenziano rispetto a quelle elaborate da microrganismi Gram positivi in quanto le prime agiscono mediante formazione di canali ionici a livello di membrana citoplasmatica e mostrano, una volta penetrate nella cellula sensibile/*target*, una spiccata attività nucleasica, mentre le seconde sono “membrana-attive”, ossia operano direttamente a livello di membrana (1).

Le batteriocine prodotte dai batteri Gram negativi aderiscono alle cellule bersaglio grazie alla presenza di specifiche unità recettoriali presenti a livello di membrana esterna delle cellule sensibili coinvolte. Quelle prodotte dai microrganismi Gram positivi non mostrano invece alcun assorbimento specifico, pur non potendosi escludere a priori la possibilità di una via di assorbimento preferenziale per quelle specifiche batteriocine caratterizzate da uno spettro d'azione più limitato (2).

Lo spettro d'inibizione delle batteriocine prodotte dai Gram negativi è strettamente correlato alla specie produttrice, mentre le batteriocine prodotte dai Gram positivi si dimostrano attive non solo verso altri batteri Gram positivi ma, occasionalmente, anche verso microrganismi Gram negativi.

Risulta poi di un certo interesse la constatazione che il *range* di sensibilità può incrementare, anche notevolmente, al variare del pH, così come in presenza di particolari sostanze chimiche che agiscono alterando l'integrità della parete batterica.

Regolazione della produzione delle batteriocine

Per quanto concerne la regolazione della produzione di batteriocine, i microrganismi Gram positivi elaborano uno specifico e personale sistema di regolazione, mentre i batteri Gram negativi si basano su diversi sistemi regolatori.

In entrambi i casi risulta di particolare rilevanza un sistema di regolazione batterica denominato *quorum sensing system*; tale sistema risulta essere influenzato dalla densità cellulare presente nel substrato (3, 4, 5).

Esistono nel mondo procariotico alcuni sistemi di controllo globale che consentono ad un microrganismo di rispondere in modo estremamente efficace ai segnali offerti dall'ambiente.

Un interessante “segnale” è, per l'appunto, quello riportabile alla presenza di altri organismi appartenenti alla stessa specie. Alcune specie batteriche, infatti, possiedono sistemi regolatori che si basano sulla percezione della densità batterica di cellule appartenenti alla stessa specie nell'ambito della popolazione. È questa forma di controllo che viene appunto definita *quorum sensing*. Si stabilisce, in altri termini, una sorta di *network* di comunicazione tra cellula e cellula, basata su fattori solubili (N-acil-L-omoserina per i batteri Gram negativi e varie unità peptidiche per batteri Gram positivi) che spesso determinano la formazione di biofilm microbici. Questo mezzo di comunicazione intercellulare viene innescato per regolare la trascrizione genica di strutture coinvolte in differenti processi fisiologici come la bioluminescenza, il trasferimento di materiale plasmidico per via coniugativa e la produzione di specifici fattori di virulenza. Svariate specie microbiche impiegano questa strategia di comunicazione per mantenere una crescita organizzata nell'ambiente, situazione

indispensabile per la sopravvivenza di taluni patogeni nell'ospite. Ciascun batterio Gram negativo che possieda questo sistema di controllo, risulta dotato di un enzima che sintetizza omoserina lattone acilato (AHL), molecola che diffonde all'esterno della cellula. All'interno della cellula l'AHL si concentra in modo specifico soltanto nel momento in cui ve ne siano numerose altre nelle vicinanze produttrici della stessa molecola. Queste molecole "segnale" a basso peso molecolare possono venire considerate come induttori che attivano la trascrizione genica da parte del cromosoma, producendo opportuni fattori di virulenza batteriocine incluse.

Batteriocine prodotte dai batteri lattici

Tra le specie batteriche presenti in natura, in particolare i batteri lattici (LAB: *lactic acid bacteria*) hanno sviluppato la capacità di produrre un'ampia gamma di batteriocine.

Le batteriocine prodotte dai LAB sono state suddivise da Kleanhammer (6) in tre classi, a cui se ne aggiunge una quarta attualmente poco nota (7):

- Batteriocine di classe I: definite lantibiotici. Si tratta di molecole a basso peso molecolare, termostabili e modificate post-traduzionalmente; la nisina rappresenta il classico prototipo delle batteriocine appartenenti a questa classe (8).
- Batteriocine di classe II: molecole di piccole dimensioni, idrofobiche e relativamente termostabili. Questa classe viene, a sua volta, suddivisa in 3 sotto-gruppi: la classe IIa (9), il gruppo più ampio e più importante per la sua attività anti-*Listeria*, la classe IIb, batteriocine formate da due peptidi, e la classe IIc, che comprende batteriocine inquadrate come *sec-dependent*, sulla base del loro intrinseco meccanismo di secrezione (10).
- Batteriocine di classe III: proteine di notevoli dimensioni e termolabili.
- Batteriocine di classe IV: molecole complesse nella cui struttura si riconoscono componenti sia di natura lipidica che glucidica.

Ruolo ecologico delle batteriocine

Le batteriocine svolgono una funzione chiave in termini "relazionali" all'interno delle diverse comunità batteriche, anche se il ruolo di queste sostanze antimicrobiche non è stato ancora definitivamente chiarito.

La sintesi batteriocinica, talvolta estremamente elevata sotto l'aspetto quantitativo, potrebbe suggerire un possibile coinvolgimento di tali sostanze sia nei meccanismi difensivi (impedisce l'invasione ad opera di altri ceppi o specie batteriche all'interno dell'*habitat* del batterio produttore), che offensivi, mettendo in atto strategie invasive con conseguente stanziamento in una particolare nicchia ecologica (4).

Applicazioni delle batteriocine in campo clinico ed alimentare

Queste sostanze a spiccata attività antimicrobica hanno riscosso un crescente interesse soprattutto per il loro possibile impiego sia in campo clinico che in quello

tecnologico/alimentare (in particolar modo le batteriocine prodotte dai batteri lattici e definite per l'appunto lantibiotici).

Per quanto attiene alle applicazioni in campo clinico, le batteriocine rappresentano una valida soluzione alternativa agli antibiotici. Infatti, grazie al loro limitato spettro d'azione, possono essere considerate “farmaci d'elezione” che agiscono specificatamente su determinati agenti patogeni; ciò consentirebbe, per lo meno in linea teorica, una drastica diminuzione dell'utilizzo degli antibiotici, riducendo in tal modo da un lato lo sviluppo di antibiotico-resistenza da parte dei ceppi patogeni e dall'altro il depauperamento della flora apatogena commensale presente nell'organismo.

Ne sia d'esempio la latticina 3147, batteriocina prodotta da *Lactococcus lactis*, che ha mostrato una spiccata attività nei confronti dei principali agenti mastitogeni Gram positivi (11, 12, 13, 14, 15). Appare quindi evidente come la latticina 3147 presenti interessanti potenzialità di utilizzo sia in fase di trattamento terapeutico che in fase di prevenzione e controllo della mastite bovina.

In campo alimentare le batteriocine possono essere utilizzate come bio-conservanti per controllare e contenere la popolazione batterica indesiderata e responsabile di intossicazioni e deterioramento della matrice alimentare.

Allo stato attuale delle cose, tuttavia, le sole batteriocine utilizzate in campo alimentare sono quelle prodotte dai batteri lattici.

In particolare la prima batteriocina, approvata nel 1988 dall'FDA (*Food and Drug Administration*) in qualità di bio-conservante, è stata la nisina, sostanza antimicrobica prodotta da *Lactococcus lactis* e appartenente alla classe dei cosiddetti lantibiotici.

Attualmente la nisina viene impiegata come bio-conservante alimentare in oltre 45 Paesi, e rimane la sola batteriocina che può essere aggiunta ai prodotti alimentari (16).

Questo bio-conservante ha trovato larga applicazione nei prodotti di origine lattiero-casearia, nelle carni, nei prodotti vegetali (frutta compresa), nei prodotti di panetteria e pescheria, così come in talune tipologie di bevande (8, 14, 17).

Oltre che per prevenire la contaminazione da parte di batteri patogeni nei prodotti alimentari, le batteriocine possono essere impiegate anche per migliorare le caratteristiche qualitative intrinseche del prodotto stesso (18).

Come diretta conseguenza di quanto finora sottolineato, l'utilizzo delle batteriocine potrebbe costituire uno strumento “tecnologicamente” corretto ed efficace, impiegabile nella produzione di quei prodotti definiti “di alta qualità” che si conservano per lunghi periodi di tempo in assenza di alterazioni ed in totale sicurezza mantenendo le caratteristiche organolettiche intrinseche.

Anche in questo settore si è dimostrata utile la nisina, in grado di agire inibendo la produzione di spore da parte dei batteri dei generi *Bacillus* e *Clostridium* e nell'ambito della produzione di differenti prodotti lattiero-caseari precedentemente sottoposti a processo di pastorizzazione (19, 20, 21).

La nisina, inoltre, si è dimostrata attiva ed efficace nei confronti di una vasta gamma di batteri Gram positivi, compresa *Listeria monocytogenes*, agente eziologico di una delle intossicazioni alimentari più frequenti e pericolose in termini sanitari, la listeriosi (22, 23).

Per completare il quadro relativo alle possibilità applicative di queste sostanze antimicrobiche, va ricordato l'utilizzo di colture batteriche produttrici di batteriocine in qualità di probiotici alimentari.

Col termine di probiotico si intende, in modo estremamente schematico, una preparazione a base di particolari microrganismi: anche in questo caso i batteri lattici sono quelli più ampiamente utilizzati a tale scopo infatti, una volta somministrati, migliorano le proprietà della microflora autoctona dell'organismo ricevente.

L'incorporazione dei microrganismi probiotici può essere estesa ai prodotti lattiero-caseari, alle formulazioni per l'infanzia, ai succhi di frutta, ai prodotti a base di cereali ed a taluni prodotti farmaceutici (24, 25).

È stata inoltre evidenziata la capacità per alcune specie batteriche, nello specifico *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, di inibire la crescita di *Helicobacter pylori*, uno dei principali agenti eziologici responsabili di ulcere gastro-duodenali, grazie alla liberazione di molecole proteiche riconducibili a specifiche batteriocine. La somministrazione in forma probiotica di queste specie batteriche ed in soggetti geneticamente predisposti previene, in primo luogo, la formazione di ulcere a livello gastroenterico e, secondariamente, ha esitato in un diretto coinvolgimento nella stabilizzazione della barriera gastrica oltre che nella riduzione dell'infiammazione mucosale.

Dati sperimentali hanno rivelato come l'utilizzo di probiotici non porti all'eradicazione definitiva e completa di *H. pylori*, ma sia in grado di contenere il livello gastrico del patogeno, inibendo in tal modo la sintomatologia clinica (26, 27, 28).

Materiali e metodi

Sono stati impiegati stipiti di *Salmonella enterica* e di *Yersinia enterocolitica* ricavati nel corso di una precedente indagine effettuata su campioni carnei destinati all'alimentazione del cane, nonché ceppi appartenenti ad altri generi, sempre isolati presso la Sezione di Microbiologia ed Immunologia del Dipartimento di Salute Animale, e riportabili a *Pasteurella* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes* spp., *Bacillus* spp. (29, 30).

Test per la produzione di colicine

Consente di saggiare l'attività batteriocinica posseduta dal ceppo di *Escherichia coli* colicina V+ (ATCC 14763), allo scopo di evidenziarne la capacità di elaborare batteriocine (colicine) attive nei confronti di altri ceppi appartenenti alla stessa specie e nei confronti di stipiti appartenenti a generi differenti.

Ceppo produttore: *Escherichia coli* colicina V+ (ATCC 14763)

Ceppi testati: 42 ceppi di *Yersinia enterocolitica* (uno dei quali di riferimento: CIP 6529), 24 stipiti di *Salmonella enterica* (di cui 2 di riferimento per *Salmonella pullorum* e *Salmonella typhi*), 4 ceppi di *Pasteurella* spp., 3 ceppi di *Aeromonas hydrophila*, un singolo ceppo riportabile a *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Alcaligenes* spp.

Metodica: tutti i ceppi, compreso il ceppo indicatore, sono stati seminati

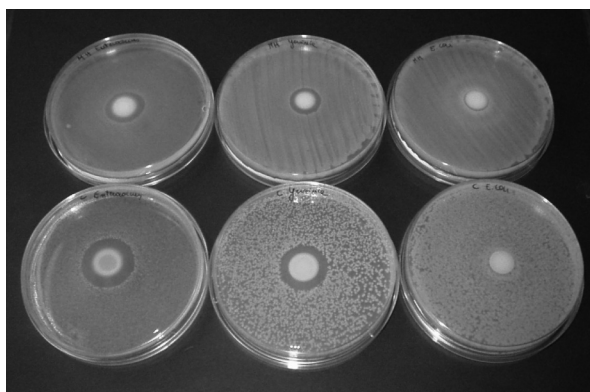
in *Tryptose broth* addizionato di estratto di lievito 0.3% e di CaCl_2 0,145%. Dopo incubazione a 37°C per 8-10 ore, sono state eseguite diluizioni del ceppo colicinico provvedendone alla semina di una aliquota pari a 0.5 ml sullo stesso terreno agarizzato. Si è proceduto quindi ad eliminare l'eventuale liquido in eccesso presente sulla superficie della piastra, lasciando la stessa ad asciugare sotto cappa sterile a flusso laminare per un periodo di almeno 20 minuti.

In seguito, la brodocoltura del ceppo da testare, in volume di 10 µl, è stata deposta al centro delle piastre, che sono state poi incubate per 16-18 ore ad una temperatura di 30°C.

La produzione di colicine si evidenzia attraverso la formazione di un alone di inibizione misurabile attorno al ceppo in esame (31, 32).

Figura 1:

immagine relativa agli aloni di inibizione riguardanti alcune delle specie batteriche prese in esame.



Risultati

I risultati relativi alla parte sperimentale vengono riportati in tabella 1.

Tabella 1:

risultati concernenti la sensibilità dei ceppi saggiati nei confronti della colicina V+.

Nella prima colonna vengono indicati i ceppi saggiati, mentre nella seconda vengono riportati i relativi diametri di inibizione evidenziati durante la prova.

CEPPO	+/-	CEPPO	+/-
<i>S. enterica tennessee 3</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica CIP 6529</i>	-
<i>S. enterica blockley 1</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 763</i>	-
<i>S. enterica enteritidis 2</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 153</i>	+ (>5mm)
<i>S. enterica dublin</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 89</i>	+ (>4mm)
<i>S. enterica tennessee 1</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 21B</i>	+ (>4mm)
<i>S. enterica java</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 47</i>	-

CEPPO	+/-	CEPPO	+/-
<i>S. enterica derby 3</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 25sd</i>	+ (>4mm)
<i>S. enterica derby 4</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 85</i>	+ (>3mm)
<i>S. enterica pullorum</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 387</i>	+ (>5mm)
<i>S. enterica st. paul 1</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 11C</i>	-
<i>S. enterica enteritidis 1</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 314</i>	-
<i>S. enterica typhi ref.</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 512</i>	-
<i>S. enterica anatum 3</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 48</i>	-
<i>S. enterica coeln C1</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 3A</i>	-
<i>S. enterica blockley 2</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 84</i>	-
<i>S. enterica thompson</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 42</i>	-
<i>S. enterica derby 1</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 391</i>	-
<i>S. enterica derby 2</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 772</i>	-
<i>S. enterica enteritidis 3</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 31</i>	-
<i>S. enterica anatum 1</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 14</i>	-
<i>S. enterica typhimurium</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 18</i>	-
<i>S. enterica anatum 2</i>	+ (>4mm)	<i>Yersinia enterocolitica 32sd</i>	-
<i>S. enterica tennessee 2</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 384</i>	-
<i>S. enterica infantis</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 911</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 293sd</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 97</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 46</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 1032sd</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 183</i>	-	<i>Bacillus subtilis</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 99</i>	-	<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 74</i>	-	<i>Streptococcus spp.</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 771</i>	-	<i>Staphylococcus spp.</i>	+ (<2mm)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	<i>Pasteurella spp. A</i>	+ (<2mm)
<i>Yersinia enterocolitica 192sd</i>	-	<i>Pasteurella spp. B</i>	+ (<2mm)
<i>Yersinia enterocolitica 71sd</i>	-	<i>Pasteurella spp. C</i>	+ (<2mm)
<i>Yersinia enterocolitica 88</i>	-	<i>Pasteurella spp. D</i>	+ (<2mm)
<i>Yersinia enterocolitica 365</i>	-	<i>Alcaligenes faecalis</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 654sd</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 34A</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila A</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 643sd</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila B</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 504sd</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila C</i>	-

Discussione e conclusioni

Innanzitutto è possibile affermare che per *Yersinia*, si è evidenziata sensibilità per 6 dei 41 stipiti saggiati (14.6% con intervallo di confidenza al 95% compreso tra i seguenti valori: 0,001 e 0,228) escludendo il ceppo di referenza; mentre per *Salmonella* si è riscontrato 1 ceppo sensibile su 22 (4.5% con intervallo di confidenza, al 95%, tra i valori 0,056 e 0,292).

Il raffronto statistico ottenuto dai dati relativi ai suddetti due generi non evidenzia significatività di relazione tra i parametri Genere, nella fattispecie *Salmonella* e *Yersinia*, e Sensibilità alle specifica batteriocina in oggetto.

Tutti e quattro gli stipiti di *Pasteurella* spp. hanno presentato sensibilità nei confronti della colicina prodotta dal ceppo di *Escherichia coli* V+, mentre, ad eccezione dello stipite di *Staphylococcus* spp. anch'esso risultato sensibile, tutte le altre specie non hanno esibito alcun alone di inibizione.

I dati riferibili a queste diverse specie batteriche, essendo stati estrapolati e ricavati da casi singoli o limitati a pochi ceppi, consentono soltanto alcune semplici considerazioni che hanno valore indicativo, costituendo un dato preliminare che necessiterebbe di ulteriori conferme e approfondimenti.

Sulla base delle considerazioni fino ad ora apportate, è possibile concludere che le batteriocine sono dotate di un elevato potenziale applicativo. Risulta, pertanto, fondamentale e necessario continuare ad approfondire le ricerche per comprendere sempre più a fondo le caratteristiche intrinseche di queste molecole, ampliando, se possibile, il loro coinvolgimento in ambito sia bio-medico che alimentare.

Ringraziamenti

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

Bibliografia

1. Bruno M.E.C., Montville T.J. (1993) Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 59(9): 3003-3010.
2. Yang R., Johnson M.C., Ray B. (1992) Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 58: 3355-3359.
3. Fuqua C., Parsek M.R., Greenberg E.P. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet*, 35: 439-68.
4. Miller M.B., Bassler B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 55: 165-99.
5. Lerat E., Moran N.A. (2004) The evolutionary history of quorum-sensing systems in bacteria. *Mol Biol Evol*, 21(5): 903-913.
6. Kleanhammer T.R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimic*,

- 70: 337-49.
7. Cotter P., Hill C., Ross R.P. (2006) What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nat. Rev. Microbiol.* doi: 10.1038/nrmicro1273-c1.
8. Twomey D., Ross R.P., Ryan M., Meaney B., Hill C. (2002) Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 165-185.
9. Kaur K., Andrew L.C., Wishart D.S., Vederas J.C. (2004) Dynamic relationship among type IIa bacteriocins: temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic alpha elix as a receptor-binding region. *Biochemistry* 43: 9009-20.
10. Holo H., Nes I.F. (2000) Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*, 55: 50-61.
11. Crispie F., Flynn J., Ross R., Hill C., Meaney W. (2004) Update on the development of a novel dry cow therapy using a bismuth-based intramammary teat seal in combination with the bacteriocin lacticin 3147. *Irish-Veterinary-Journal*, 57(11): 652-656.
12. Galvin M., Hill C., Ross R.P. (1999) Lactocin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Lett Appl Microbiol*, 28: 255-258.
13. Mc Auliffe O., Ryan M.P., Ross R.P., Hill C., Breeuwer P., Abee T. (1998) Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Appl Environ Microbiol*, 64: 439-445.
14. Ross R.P., Galvin M., Mc Auliffe O., Morgan S.M., Ryan M.P., Twomey D.P., Meaney W.J., Hill C (1999) Developing application for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 337-346.
15. Ryan M.P., Meaney W.J., Ross R.P., Hill C. (1998) Evaluation of lactocin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl Environ Microbiol*, 64: 2287-2290.
16. Delves-Broughton J., Blackburn P., Evans R.J., Hugenholtz J. (1996) Application of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69: 193-202.
17. Luchansky J.B. (1999) Overview on applications for bacteriocin-producing lactic acid bacteria and their bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 335.
18. Morgan S., Ross R.P., Hill C. (1995) Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcin A, B and M. *Appl Environ Microbiol*, 61: 2995-3001.
19. Cortezzo D.E., Setlow B., Setlow P. (2004) Analysis of the action of compounds that inhibit the germination of spores of *Bacillus* species. *J. of Appl. Microbiol.* 96(4): 725-741.
20. Lopez-Pedemonte T.J., Roig-Sagues A.X., Trujillo A.J., Capellas M., Guamis B. (2003) Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *J. Dairy Sci.* 86: 3075-3081.
21. Hakovirta J., Reunanen J., Saris P.E.J. (2006) Bioassay for nisin in milk, processed cheese, salad dressings, canned tomatoes, and liquid egg products.

- Appl. Envir. Microbiol. 72: 1001-1005.
22. Martinez B., Rodriguez A. (2005) Antimicrobial susceptibility of nisin resistant *Listeria monocytogenes* of dairy origin. FEMS-Microbiology-Letters, 252(1): 67-72.
23. Schillinger U., Becker B. Vignolo G., Holzapfel W.H. (2001) Efficacy of nisin in combination with protective cultures against *Listeria monocytogenes* Scott A in tofu. Intern J Food Microbiol, 71: 159-168.
24. Salminen S., Isolauri E., Salminen E. (1996) Clinical uses of probiotics for stabilising the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. Antonie van Leeuwenhoek 70: 251-262.
25. Soomro A.H., Masud T., Anwaar K. (2002) Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. Pakistan Journal of Nutrition, 1: 20-24.
26. Gotteland M., Brunser O., Cruchet S. (2006) Are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? Aliment Pharmacol Ther, 23(8): 1077-1086.
27. Ghosh S., Van Heel D., Playford R.J. (2004) Probiotics in inflammatory bowel disease: is it all gut flora modulation? Gut, 53: 620-622.
28. Le Duc H., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques A.O., Cutting S.M. (2004) Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. App and Envir Microbiol 70(4): 2161-2171.
29. Brindani F., Ossiprandi M.C., Paterlini F., Perini S. (1995) Attività batteriocinica in stipiti di *Pasteurella*. Obbiettivi e Documenti Veterinari 5: 45-47.
30. Ossiprandi M.C., Cattabiani F., Bottarelli E. (2003) Batteri enteropatogeni in carne macinata destinata all'alimentazione del cane. L'Igiene Moderna 120: 225-239.
31. Cabo M.L., Murado M.A., Gonzalez M.P., Pastoriza L. (1999) A method for bacteriocin quantification. J of App Microbiol, 87: 907-914.
32. Parente E., Brienza C., Moles M., Ricciardi A. (1995) A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. Journal of microbiological methods, 22(1): 95-108.

DIOSSINE, FURANI PCB E ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE STATO DELL'ARTE

Pizzin Gisella*, Stefano Bentley*

PAROLE CHIAVE:

diossine, furani, PCB, alimenti di origine animale.

KEY WORDS:

dioxins, furans dioxin-like PCBs, foods animal origin.

Riassunto

Nel presente lavoro con il termine Diossina si indica un gruppo di 75 congeneri di policlorodibenzodiossine (PCDD) e 135 congeneri di policlorodibenzofurani (PCDF), 17 dei quali hanno rilevanza tossicologica. I policlorobifenili (PCB) costituiscono un gruppo di 209 congeneri diversi che possono essere suddivisi in due gruppi in base alle loro proprietà tossicologiche: un gruppo esiguo (12) presenta proprietà tossicologiche simili alle diossine e pertanto definite "PCB diossina-simili" (PCB-dl) e una parte non presenta una tossicità simile a quella delle diossine pertanto definite non dissina simile (PCB-nl).

Nel tessuto umano sono stati riscontrati i seguenti composti: 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8 PCDD, 1,2,3,6,7,8-Hx CDD, 2,3,4,7,8-PCDF, PCB 126, che rappresentano 80% del totale TEQ.

L'SCF (comitato scientifico dell'alimentazione umana) ha fissato una dose settimanale tollerabile (TWI, Tolerable Weekly Intake) per le diossine e i PCB-dl pari a 14 pg OMS-TEQ/Kg peso corporeo.

I dati relativi all'esposizione evidenziano che la popolazione Europea assume con l'alimentazione una dose superiore a quella tollerabile, (da 8,4 a 21) mg TEQ/g lipidi. Per garantire la tutela dei consumatori, è importante e necessario ridurre l'esposizione dell'uomo alle Diossine e ai PCB diossina-simile. Pertanto tutti gli operatori della catena alimentare devono continuare ad adoperarsi per limitare la presenza di Diossine e PCB nei prodotti alimentari come stabilito dai Regolamenti (CE) n. 466/2001 e 199/2006. I livelli massimi fissati sono la somma delle diossine e dei PCB diossina-simili espressi in equivalenti di tossicità dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) utilizzando gli OMS-TEFs.

Gli alimenti di origine animale con maggior livello di contaminazione sono i prodotti lattiero-caseari, il latte, la carne di manzo, la carne di maiale, le carni di pollo e selvaggina allevata, pesce e prodotti a base di pesce di acqua dolce e di mare.

* Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Ispezione degli Alimenti di origine animale

Summary

Dioxin as referred to this abstract cover a group of 75 polychlorinated dibenzo-p-dioxin (PCDD) congeners and 135 polychlorinated dibenzofuran (PCDF) congeners, 17 of which are toxicological concern Polychlorinated biphenyls (PCBs) are a group of 209 different congeners which can be divided into two groups according to their toxicological properties: a small number exhibits toxicological properties similar to dioxins and are therefore often named "dioxin-like PCBs".

The majority do not exhibit dioxin-like toxicity but has a different toxicological profile. In human tissue were found the following substances: 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8 PCDD, 1,2,3,6,7,8-Hx CDD, 2,3,4,7,8-PCDF, PCB 126 which represent 80% of total TEQ.

The SCF fixed a tolerable weekly intake (TWI) of 14 pg WHO-TEQ/kg body weight for dioxin and dioxin-like PCBs. Exposure estimate indicate that a considerable proportion of the Community population have a dietary intake in excess of TWI (8-21 pgTEQ/g fat).

The reduction of human exposure to dioxins and dioxin-like PCBs through food consumption is important and necessary to ensure consumer protection. Therefore all food chain operators must continue to make all possible effort and to do all is necessary to limit the dioxins and PCBs present in food, according to maximum levels fixed in the Regulations (EC) n. 466/2001 and 199/2006. In this Regulation it is proposed to set maximum levels for the total amount of dioxins and dioxin-like PCBs expressed in World Health Organisation (WHO) toxic equivalents, using the WHO-TEFs.

The highest concentration have been observed in: dairy, milk, beef, pork, poultry, other meats, freshwater fish and shellfish, marine fish and shellfish.

Introduzione

Le classi di inquinanti organici persistenti (POS) riconosciute a livello internazionale sono dodici. In questo lavoro si esamineranno tre di queste e precisamente le **diossine, furani e policlorobifenili** riscontrate negli alimenti di origine animale, si tratta di prodotti particolarmente stabili e riconosciuti come tossici sia nell'ambiente sia in taluni prodotti alimentari.

Le diossine o policlorodibenzodiossine (PCDD) e policlorodibenzofurani (PCDF) hanno costituito un pericolo per l'uomo in più significative occasioni nella seconda metà del 1990 ed anche attualmente costituiscono un problema per la salute pubblica. Oltre ai casi clamorosi associati ad incidenti industriali, a pratiche alimentari e/o ambientali intenzionalmente fraudolente, all'impiego di defolianti in eventi bellici recenti, etc., ricordiamo anche i casi di contaminazione della produzione alimentare inattesi, poiché avvenuti con processi errati, ma non necessariamente dolosi, o da materiali naturali teoricamente integri e, al contrario, contaminati. Nel primo caso, possiamo ricordare, per esempio, la contaminazione del latte vaccino dovuta alle ricadute aeree, da impianti d'incenerimento di RSU di vecchia generazione su

pascolo, (1980) e del “pastazzo d’agrumi” proveniente dal Brasile e utilizzato quale integratore nell’alimentazione dei bovini (1999).

Tra i secondi, si ricorda il caso dell’integratore per mangimi a base di cloruro di colina (2000) contaminato a causa del supporto ligneo, segatura di falegnameria e non la prescritta sfarinatura di tutolo di mais, e delle argille destinate all’impiego come antiaggreganti per mangimi e prelevate da cave integre ma abbastanza sorprendentemente contaminate da diossine d’origine biogenica (2004). Un gruppo di sostanze identificate quali naturali precursori di PCDD e PCDF sono i clorofenoli e i loro sali ed esteri. In particolare, è noto da qualche tempo come il pentaclorofenolo, i suoi derivati, e i loro formulati possano contenere all’origine quantità dei predetti tossici a livelli analitici complessivi dell’ordine del mg/kg fino al g/kg [WHO 1989, 1997]. In genere, si nota la predominanza degli omologhi delle PCDD a più alta clorosostituzione e, in particolare, dell’ottaclorodibenzodiossina (O8CDD). Anche l’esposizione alla luce solare diretta e/o al calore (es. combustione) possono convertire il pentaclorofenolo in tali più tossici e persistenti composti. La letteratura scientifica offre, peraltro, numerosi esempi di contaminazione da diossine della produzione alimentare riconducibile all’uso di pentaclorofenolo.

Premessa

Lo scopo del presente lavoro è di fornire indicazioni in merito alle problematiche sanitarie derivanti dalla presenza di tali inquinanti negli alimenti d’origine animale.

Le diossine sono sostanze immesse nell’ambiente da numerose sorgenti, presentano una certa mobilità nei confronti delle diverse matrici ambientali, hanno una struttura chimica stabile ed una considerevole vita media. Esse possono determinare un inquinamento cronico, pressoché ubiquitario e possono dar luogo ad eventi che, potremmo definire “emergenze ambientali”; infatti, si possono verificare situazioni in cui vi siano particolari catene alimentari che, attraverso fenomeni di bioaccumulo e pratiche antropiche, portino le concentrazioni a livelli pericolosi per l’ambiente e/o l’uomo anche a fronte di una presenza di inquinanti bassa, o addirittura bassissima, che non comporterebbe rischi immediati e chiaramente identificabili.

La gestione di queste situazioni richiede studi complessi, che consentano di individuare particolari pratiche/abitudini antropiche e eventuali catene alimentari critiche per l’uomo, o gli animali, ed infine l’adozione di strumenti conoscitivi quali l’analisi del rischio per valutare la necessità e la tipologia delle possibili azioni mitigative o contenitive.

Diossine e furani

Dati generali

Con il termine generico di “diossine” si indica un gruppo di 210 composti chimici aromatici policlorurati, ossia formati da carbonio, idrogeno, ossigeno e cloro, divisi in due famiglie: policlorodibenzo-p-diossine (PCDD o propriamente “diossi-

ne”) e policlorodibenzo-p-furani (PCDF o “furani”) composti eteroaromatici triciclici quasi planari caratterizzati da proprietà chimiche simili. Entrambi sono costituiti da due anelli benzenici collegati da uno o due atomi di ossigeno.

In base al numero e alla posizione degli atomi di cloro è possibile distinguere 75 congeneri di PCDD e 135 congeneri di PCDF. Si parla invece di omologhi per indicare gruppi di congeneri con lo stesso numero di atomi di cloro.

Tabella 1: Omologhi e congeneri di PCDD e PCDF

OMOLOGHI (abbreviazione)	NUMERO DEI CONGENERI	
	PCDD	PCDF
Monocloro (M1)	2	4
Di Cloro (D3)	10	16
Tricloro (T3)	14	28
Tetracloro (T4)	22	38
Pentacloro (P5)	14	28
Hexacloro (H6)	10	16
Heptacloro (H7)	2	4
Octacloro (O6)	1	1
Totale	75	135

Si tratta di idrocarburi aromatici clorurati, per lo più di origine antropica, particolarmente stabili e persistenti nell'ambiente, tossici per l'uomo, gli animali e l'ambiente stesso; come già sopra ricordato le diossine e i furani costituiscono, infatti, due delle dodici classi di inquinanti organici persistenti riconosciute.

I PCDD e i PCDF non sono prodotti industriali, ma sottoprodotti indesiderati di reazioni chimiche, termiche (incompleta combustione di materiale organico alla presenza di cloro), fotochimiche ed enzimatiche.

Le diossine, considerate dei contaminanti globali, sono da una molteplicità di fonti di emissione: processi di combustione, incenerimento rifiuti solidi urbani, rifiuti pericolosi, rifiuti ospedalieri, incenerimento carcasse animali, combustione pneumatici, combustibili per veicoli, carbone, petrolio, legna lavorazione metalli (rame, alluminio, piombo), produzione di pesticidi ed erbicidi aromatici policlorurati, produzione di fenoli clorurati, produzione di solventi clorurati e di vinil cloruro. Suoli e sedimenti contaminati in passato rilasciano in atmosfera piccole concentrazioni di contaminanti.

La tossicità delle diossine dipende dal numero e dalla posizione degli atomi di cloro sull'anello aromatico, gli isomeri che hanno il cloro nella posizione 2,3,7,8, sono quelli più tossici e dotati della maggior capacità di accumulo.

Nella terminologia corrente il termine “diossina”, al singolare questa volta, è talora usato come sinonimo della 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-diossina (TCDD), ossia del congenere maggiormente tossico (unico riconosciuto possibile cancerogeno per l'uomo) che ha 4 atomi di cloro, (Needham et al., 1991).

Le diossine sono sostanze semivolatili, termostabili, scarsamente polari, insolubili in acqua, altamente liposolubili, estremamente resistenti alla degradazione chimica e biologica.

Nel suolo si legano alla frazione organica presente e, una volta adsorbite (ovvero “legate” e concentrate su una superficie rappresentata, ad esempio, dalla fase solida del suolo), rimangono relativamente immobili: a causa della loro insolubilità in acqua non tendono a migrare in profondità.

Pur essendo scarsamente idrosolubili, trovano nell’acqua un’ottima via di diffusione una volta adsorbite sulle particelle minerali ed organiche presenti in sospensione. Le caratteristiche chimico-fisiche sopra richiamate, fanno diventare tali sostanze facilmente trasportabili dalle correnti atmosferiche e, in misura minore, dai fiumi e dalle correnti marine, rendendo così possibile la contaminazione di luoghi lontani dalle sorgenti di emissione. A causa della loro presenza ubiquitaria nell’ambiente, persistenza e liposolubilità, le diossine tendono, nel tempo, ad accumularsi negli organismi viventi, si accumulano cioè nei tessuti ed organi dell’uomo e degli animali. Inoltre, salendo nella catena trofica (alimentare), la concentrazione di tali sostanze può aumentare (biomagnificazione), giungendo ad esporre a rischio maggiore il vertice di detta catena.

Modalità di ingresso nella catena alimentare

Sulla base delle conoscenze ad oggi disponibili, il meccanismo primario di ingresso delle diossine nella catena alimentare terrestre sembrerebbe essere la deposizione atmosferica in fase di vapore sulle foglie delle piante e, parzialmente sul terreno ingeriti successivamente dagli animali.

Le diossine sono sostanze che si accumulano nei tessuti grassi degli organismi, quindi se erba e suolo contaminati sono ingeriti da erbivori si verifica un accumulo di queste sostanze nei grassi delle carni e nel grasso del latte prodotto, (Hulster et al., 1993; Travis et al., 1988).

In generale, per aree non particolarmente interessate da emissioni a carattere industriale, la presenza di diossine nell’ambiente deriva, prevalentemente, non dalle emissioni attuali, ma dall’accumulo continuo e prolungato di quantità, anche piccole, di questi contaminanti nelle cosiddette “riserve ambientali”.

L’ingresso delle diossine nella catena alimentare acquatica avviene, soprattutto, ad opera del particolato (deposizione secca ed umida, erosione, scarichi, ecc.) che è trasferito nell’ambiente acquatico. La natura lipofila delle diossine e la loro bassa solubilità in acqua fa sì che queste siano adsorbite ai composti organici e bioaccumulate, negli organismi acquatici con diverse modalità di assunzione. Con il termine bioaccumulo si indica quel fenomeno di accumulo irreversibile di una sostanza nei tessuti degli organismi viventi. L’assunzione di diossine da parte degli organismi acquatici avviene attraverso la bioconcentrazione dall’acqua e il trasferimento nelle reti trofiche.

La quantità di diossine bioaccumulate da tali organismi dipende fortemente, oltre che dalla concentrazione di diossine presenti nell’ambiente acquatico, dalla percentuale di contenuto in grasso dell’organismo. Dalle considerazioni sopra esposte

si può concludere che le diossine sono contaminanti ubiquitari; in conseguenza di ciò tutti noi abbiamo accumulato una quantità di diossine più o meno significativa che varia in funzione delle abitudini alimentari, delle caratteristiche dell'ambiente che ci circonda, delle caratteristiche fisiche. Occorre però ricordare che non tutte le diossine presenti nell'ambiente sono "biodisponibili", ovvero essere in forma tale da "passare" nella catena alimentare e provocare un impatto sulla salute. La biodisponibilità dipende dalle caratteristiche ambientali (suolo, acque, sedimenti) e dalle caratteristiche del contaminante, le sostanze appartenenti alla categoria "diossine" hanno diverse caratteristiche chimico-fisiche e tossicologiche.

Il meccanismo di tossicità

Il meccanismo di tossicità nei tessuti animali risulta mediato dal recettore cellulare AHR (aryl hydrocarbon receptor), costituito da una proteina solubile intracellulare in grado di legarsi con numerose sostanze aromatiche.

Il modello più utilizzato per spiegare il meccanismo molecolare d'azione dei composti d'interesse è costituito dall'induzione del citocromo microsomale P-4501A1 AHR-dipendente (Jana, et al., 1998).

La molecola di T4CDD, presente nei tessuti allo stato libero, diffonde all'interno della cellula dove forma un legame con il recettore AHR, cui è molto affine. Il complesso T4CDDHR subisce una serie di modificazioni conformazionali, durante le quali la proteina HSP 90 (heat shock protein) e le altre proteine si distaccano dal complesso, il quale acquisisce la capacità di legarsi al DNA, in particolare a specifiche sequenze, dette DRE (dioxin responsive elements) adiacenti al gene che controlla la sintesi del DNA (DNA bending) distruzione della cromatina, aumentata accessibilità al promotore ed aumento della velocità di trascrizione del gene per il citocromo P-4501A 1.

La presenza del complesso AHR in differenti specie e tessuti, insieme alla capacità di agire come transattivatore legante-dipendente dell'espressione genica suggerisce che molti degli effetti tossici e biologici dei composti in esame risultano da alterazioni differenziali dell'espressione genica delle cellule suscettibili (APAT 2005).

Valutazione dell'esposizione alle diossine

L'uomo può venire in contatto con le diossine attraverso tre principali fonti di esposizione: accidentale, occupazionale ed ambientale. La prima riguarda contaminazioni dovute ad incidenti, la seconda riguarda gruppi ristretti di popolazione (professionalmente esposti), come nel caso di coloro che lavorano nella produzione di pesticidi o determinati prodotti chimici. L'esposizione ambientale, infine, coinvolge potenzialmente ampie fasce della popolazione ed avviene, per lo più, attraverso l'alimentazione con cibo contaminato.

Recenti studi hanno stimato che circa il 95% dell'esposizione alle diossine avviene attraverso cibi contaminati ed, in particolare, di grassi animali, anche se vi possono essere altre vie di esposizione quali l'inalazione di polvere o il contatto.

(Muller H.E., 1997).

Policlorobifenili (PCB)

Dati generali

A differenza delle diossine i PCB sono sostanze chimiche prodotte deliberatamente tramite processi industriali, sono ricavati a partire dal petrolio e dal catrame, dai quali si estrae il benzene, che è successivamente trasformato in bifenile, ed infine clorurato a policlorobifenile.

I policlorobifenili (PCB) o PCBdl (PCB dioxin like) i sono una serie di composti aromatici biciclici costituiti da molecole di bifenile variamente clorate.

Si tratta di molecole sintetizzate all'inizio del secolo scorso e prodotte commercialmente fin dal 1930, sebbene attualmente in buona parte banditi a causa della loro tossicità e della loro tendenza a bioaccumularsi.

In base alla posizione degli atomi di cloro nella molecola del bifenile si possono ottenere 209 congeneri: e la nomenclatura IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) assegna ad ogni congenere un numero tra 1 e 209.

Le caratteristiche fisico-chimiche dei congeneri dei PCB variano notevolmente con dirette conseguenze su persistenza e bioaccumulo dei singoli congeneri. I congeneri dei PCB sono suddivisi in due gruppi in base alla diversa possibilità che hanno gli atomi di cloro di disporsi su un unico anello del bifenile o su entrambi.

I PCB sono caratterizzati da bassa solubilità in acqua (approssimativamente, inversamente proporzionale al grado di clorurazione), elevata lipofilia che ne favorisce l'elevata persistenza ambientale e il bioaccumulo.

Questi composti chimici molto stabili, resistenti al calore, agli acidi, alcali ed alla fotodegradazione, non sono ossidabili, non attaccano i metalli, sono poco solubili in acqua, ma lo sono in olio e solventi organici, quali alcool e acetone. Non sono infiammabili (quando la loro molecola contiene più di 4 atomi di cloro), evaporano ad oltre 800°C e si decompongono solo oltre i 1000°C. Sono poco volatili, si possono spandere su superfici formando sottili pellicole, hanno bassa costante dielettrica, densità maggiore dell'acqua, elevata lipoaffilia e sono scarsamente biodegradabili.

I PCB erano diffusamente utilizzati in un'ampia gamma di applicazione prima che nel 1985 fossero vietati il commercio e l'uso nei fluidi dielettrici in trasformatori e condensatori, fluidi idraulici, veicolanti o diluenti sinergici dei pesticidi, plastificanti, ritardanti di fiamma, fungicidi, componenti di vernici, (Stringer et al., 1995).

Altre fonti di contaminazione, relativamente meno importanti, sono l'inquinamento dei rifiuti, la concimazione dei terreni con fanghi provenienti dalla depurazione di acque di scarico, la combustione di olii usati, le riserve di PCB nei sedimenti marini, fluviali e nei fanghi di dragaggio dei porti.

La produzione di miscele commerciali di PCB è stata interrotta a partire dagli anni 1970, tuttavia, il loro impiego, lo smaltimento improprio e l'elevata persistenza ambientale li rendono ancora presenti diffusamente come contaminanti ambientali (Greenpeace, 1993).

È stato stimato che all'inizio del secolo scorso erano state prodotte e com-

mercializzate più di un milione di tonnellate di PCB (European Commission, 2000, 2001).

La tossicità dei PCB saggiata in animali da laboratorio o nell'essere umano esposto accidentalmente in modo acuto si manifesta con disordini cutanei, perdita di peso, danni epatici, disfunzioni endocrine e riproduttive. Inoltre è stata evidenziata una loro attività come cancerogeni, però messi in dubbio a più riprese.

Dal punto di vista tossicologico sono da considerare i PCB coplanari, strutturalmente simili alla 2,3,7,8 T 4 CDD. Solo 12 dei 209 congeneri dei PCB, i cosiddetti coplanari, presentano caratteristiche chimico-fisiche e tossicologiche paragonabili alle diossine e ai furani: questi sono definiti PCB dioxin-like (cioè simili alle diossine) e indicati con la sigla PCBdl. Gli elementi più importanti nel determinare lo stesso meccanismo di azione della 2,3,7,8-TCDD risultano le dimensioni molecolari e la conformazione planare dei congeneri dei PCB. Queste caratteristiche strutturali dipendono dal numero di atomi di cloro e soprattutto dalle loro posizioni (orto, meta e para) nella molecola del bifenile. Ed è proprio questa somiglianza strutturale a far sì che i PCB coplanari agiscano, a livello cellulare, in maniera simile alla 2,3,7,8-TCDD, interazione che non è possibile per i congeneri non planari, detti non diossina-simili PCB nl, infatti, gli effetti dei PCBdl sulla salute umana e sugli organismi sono analoghi a quelli evidenziati per le diossine.

Nella Tabella 2 sono elencati i PCBdl con i relativi fattori di tossicità equivalente (TEF) per gli esseri umani e per i mammiferi.

Tabella 2: PCB dioxin-like e relativi fattori di tossicità equivalente PCBdl (nome IUPAC) PCB-TEF, WHO-TEF (Van den Berg et al 1998)

3,3',4,4'-TCB	(77)	0,0005	0,0001
3,4,4',5-TCB	(81)	0,0001	0,0001
3,3',4,4',5-PeCB	(126)	0,1	0,1
3,3',4,4',5,5'-HxCB	(169)	0,01	0,01
2,3,3',4,4'-PeCB	(105)	0,0001	0,0001
2,3,4,4',5-PeCB	(114)	0,0005	0,0005
2',3,4,4',5-PeCB	(118)	0,0001	0,0001
2,3,3',4,4',5-HxCB	(123)	0,0001	0,0001
2,3',4,4',5,5'-HxCB	(156)	0,0005	0,0005
2,3',3,4',4,5'-HxCB	(157)	0,0005	0,0005
2,3',4,4',5,5'-HxCB	(167)	0,00001	0,00001
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	(189)	0,0001	0,0001

(T = tetra, Pe = penta, Hx = hexa, Hp = hepta)

Contaminazione degli alimenti di origine animale

L'assunzione di latte e latticini contaminati diossine e PCB rappresenta approssimativamente il 37% dell'esposizione dell'uomo a queste sostanze, tuttavia una

percentuale apprezzabile del totale deriva dall'assunzione di carni bovine (14%), suine (5%) e di pesce e prodotti a base di pesce (26% di cui 19% di acqua dolce ed il 7% di mare), oli di origine vegetale (6%), la restante percentuale suddivisa con uova carni di pollo e altre carni (EFSA, 2004). Il livello di residui di PCB, PCDD e PCDF nei diversi alimenti (carcasse, uova, latte, pesci, molluschi), sembra essere influenzata non solo dalla quantità e dal grado di alogenazione del composto assunto, ma può variare anche in funzione della specie, delle dimensioni, del contenuto in grassi, delle capacità metaboliche, del sesso, età e del tipo di alimentazione, nonché di fattori legati all'ambiente e naturalmente all'intervallo intercorso tra contaminazione e momento della produzione animale (Amendola et al., 1986).

Per le specie ittiche possono intervenire anche altri fattori quali il livello trofico e i caratteri fisici dei corpi d'acqua, il loro grado di inquinamento, la stagione e la disponibilità di alimento.

Una raccolta organica dei dati relativamente ai riscontri analitici nelle diverse matrici alimentari è stato pubblicato dall'Istituto Superiore di Sanità nel (1999); i valori riportati come livelli di contaminazione media espressa in pgTEQ/g prodotto intero sarebbero di:

pesce di acqua dolce ca. 1
prodotti caseari ca. 0,1-0,4
carne di maiale < 0,3
carne di Manzo ca. 0,2,0,3
carne di pollo ca. 0,1, 0,2
uova <0,2
latte ca. 0,02-0,05

Prodotti lattiero caseari (latte, burro, formaggio) 0,7, 2,5 pg/TEQ/g grasso (Panebianco et al., 2000).

Dal Piano Nazionale Residui del 2000 è stato introdotto il monitoraggio delle diossine nelle carni bovine, suine, di pollame, nei prodotti dell'acquacultura, nonché nel latte bovino e ovicaprino, uova e mangimi. Per il miele è prevista la sola ricerca dei PCB. In ogni caso, per quei prodotti in cui non sia stata prevista la ricerca di PCDD e PCDF, espressa attraverso la determinazione quantitativa dei 17 congeneri 2,3,7,8 clorosostituiti, essa deve essere eseguita nel caso in cui si riscontrino valori di PCB totali, i valori di PCBs rappresentano la somma di 18 congeneri (28, 52, 95, 99, 101, 105, 110, 118, 138, 146, 149,151, 153, 170, 177, 180, 183, 187), *la scelta dei congeneri deriva dalle indicazioni inerenti all'accertamento dei livelli PCBs previsto dal Piano Nazionale Residui*, (PNR), questi congeneri sono ritenuti rappresentativi del profilo di contaminazione totale degli alimenti di origine animale superiore al limite di azione di 100 ng/g (base lipidica) fanno eccezione i prodotti dell'acquacultura.

Il metodo migliore per ridurre l'esposizione a queste sostanze è, ad oggi, l'adozione di un regime alimentare povero di grassi animali.

Fattore di tossicità equivalente

Generalmente le diossine non sono rilevate nelle diverse matrici come sin-

goli composti, ma come miscele complesse dei diversi congeneri; si afferma, inoltre, che non tutti i congeneri sono tossici o lo sono alla stessa maniera. Per riuscire a esprimere la tossicità dei singoli congeneri, è stato introdotto il concetto di fattore di tossicità equivalente (TEF*). I Toxicity Equivalence Factor (TEF), si basano sulla considerazione che i PCDD e i PCDF sono composti strutturalmente simili che presentano il medesimo meccanismo strutturale di azione (attivazione del recettore Ah) e producono effetti tossici simili: proprio il legame tra le diossine e il recettore Ah è il passo chiave per il successivo innescarsi degli effetti tossici.

I TEF sono calcolati confrontando l'affinità di legame dei vari composti organoclorurati con il recettore Ah, rispetto a quella della 2,3,7,8-TCDD, considerando l'affinità di questa molecola come il valore unitario di riferimento. Per esprimere la concentrazione complessiva di diossine nelle diverse matrici si è introdotto il concetto di tossicità equivalente (TEQ) che si ottiene sommando i prodotti tra i valori TEF dei singoli congeneri e le rispettive concentrazioni, espresse con l'unità di misura della matrice in cui sono riscontrate, in altre parole:

Due schemi di classificazione sono stati proposti nel 1988 per i TEF quello NATO/CCMS (North Atlantic Treaty Organization/Committee on the Challenges of Modern Society) e quello del World Health Organization (WHO 1998).

Il Dipartimento della Salute degli Stati Uniti (Department of Health and Human Services, HHS), congiuntamente al Dipartimento per l'Agricoltura (U.S. Department of Agriculture, USDA), pubblicano ogni 5 anni, a partire dal 1980, delle linee-guida contenenti indicazioni sulla dieta da seguire per ridurre l'esposizione a contaminanti tossici e/o cancerogeni, (Dietary Guidelines for Americans, Gennaio 2005).

Tabella 3: I fattori di tossicità equivalente secondo NATO e WHO
PCDD/F I-TEFs (NATO/CCMS, 1988) WHO-TEFs (Van den Berg et al, 1998)

PCDD		
2,3,7,8-TCDD	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	0,5	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	0,01
OCDD	0,001	0,001
PCDF		
2,3,7,8-TCDF	0,1	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	0,05

2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	0,5
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01	0,01
OCDF	0,001	0,0001

(T = tetra, Pe = penta, Hx = hexa, Hp = hepta, O = octa)

Effetti sulla salute umana

L'uomo, in quanto vertice della catena trofica, risulta esposto alle conseguenze derivanti dalla presenza di diossine nell'ambiente anche a concentrazioni basse o addirittura bassissime. Qui di seguito si sintetizzano gli effetti maggiormente noti di tali contaminanti sull'organismo, evidenziando che si tratta prevalentemente di patologie conseguenti a esposizioni acute tipiche di eventi incidentali e/o esposizioni professionali. Occorre inoltre osservare che, in alcuni casi, la relazione causa-effetto tra esposizione alla contaminazione ed effetti sull'organismo non è stata pienamente accertata.

Studi condotti su animali e sull'uomo evidenziano le alterazioni a carico del sistema immunitario indotte da diossine anche a dosi molto limitate. Tali alterazioni consistono nella riduzione e nel danneggiamento della popolazione dei linfociti la cui funzione importante nella difesa dell'organismo è nota da tempo.

Altri studi evidenziano come l'azione delle diossine può essere particolarmente dannosa durante lo sviluppo fetale, al momento cioè della differenziazione tissutale del sistema immunitario, determinando alterazioni a lungo termine, sia in senso immunodepressivo sia ipersensibilizzante.

Altri importanti effetti delle diossine si riscontrano a livello del sistema endocrino; tali contaminanti vengono, infatti, classificati tra i modulatori endocrini, termine che indica "un agente esogeno che interferisce con produzione, rilascio, trasporto, metabolizzazione, legame, azione o eliminazione di ormoni naturali del corpo, responsabili del mantenimento dell'omeostasi (situazione che consente di mantenere in uno stato di equilibrio biochimico dinamico le condizioni di vita dell'ambiente interno del nostro organismo) e della regolazione dei processi riproduttivi e gli sviluppo".

Nei feti esposti a concentrazioni di diossine pari o lievemente superiori ai valori di base durante la fase gestazionale sono stati riscontrati effetti sullo sviluppo del sistema nervoso e sulla neurobiologia del comportamento, oltre che effetti sul-

l'equilibrio ormonale della tiroide. Le informazioni riportate sono quindi da intendersi come una sintesi dei dati disponibili. La TCDD è stata riconosciuta quale agente cancerogeno per l'uomo (classificata gruppo 1) dall'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro. L'esposizione cronica subletale alla TCDD provoca un accumulo di porfirine nel fegato ed un incremento dell'escrezione urinaria di questi metabolici. Nei casi conclamati, l'accumulo di porfirine si estende anche alla milza ed ai reni. La TCDD è irritante per gli occhi, la cute e il tratto respiratorio. La sostanza può determinare effetti, anche in tempi ritardati rispetto all'esposizione, sul sistema cardiovascolare, sul tratto gastrointestinale, sul fegato, sul sistema nervoso e sul sistema endocrino. Contatti ripetuti o prolungati con la cute possono causare dermatiti.

Le norme e i limiti per le diossine negli alimenti

Le diossine sono contaminanti che permangono inalterati nell'ambiente per molti anni e riescono, direttamente o per mezzo di catene trofiche, ad arrivare fino agli alimenti; infatti, oltre il 90% dell'esposizione umana alle diossine è riconducibile agli alimenti. In tale contesto i prodotti della pesca ed altri prodotti di origine animale determinano oltre l'80% dell'esposizione totale.

Il comitato scientifico dell'alimentazione umana (SCF Scientifica Committee on Food) dell'Unione Europea ha adottato in data 30 maggio 2001 un parere sulla valutazione dei rischi delle diossine e PCBdl nei prodotti alimentari ha stabilito un valore cumulativo per la dose tollerabile settimanale (Tolerable Weekly Intake, TWI*) di diossine pari a 14 picogrammi (pg) di equivalente tossico (TEQ toxicity equivalence) per chilogrammo di peso corporeo (Total TEQ=sommatoria C congenere x TEFcongener); tale valore è stato ripreso dal Report EFSA del 2004.

Dati rappresentativi sull'assunzione settimanale indicano che i valori medi di diossine assunti con la dieta alimentare nell'Unione Europea sono compresi tra 8,4 e 21 pg di equivalente tossico (TEQ)/kg di peso corporeo/settimana, il che significa che una notevole parte della popolazione europea si troverebbe ancora al di sopra del limite della dose tollerabile settimanale.

Gli studi eseguiti indicano che i seguenti composti, 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8 PCDD, 1,2,3, 6, 7,8-Hx CDD, 2,3,4,7,8 -PCDF, PCB 126 rappresentano l'80% del totale TEQ presente nei tessuti umani.

Il Regolamento CE 199/2006 della Commissione, del 03 Febbraio 2006, definisce per la prima volta i tenori massimi delle diossine e PCB presenti nelle derrate alimentari. Per le diossine i livelli massimi sono fissati principalmente per gli alimenti di origine animale:

Allegato 1 Regolamento della Commissione 199/2006 03 Febbraio 2006

Diossine: somma di PCDD e PCDF espressi in equivalenti di tossicità dell'Organizzazione mondiale della Sanità (OMS) utilizzando gli OMS-TEF, e somma di diossine e PCB diossina-simili (somma di PCDD PCDF e PCB, espressi in equivalenti di tossicità dell'OMS utilizzando gli OMS-TEF (fattori di tossicità equivalente, 1997).

Prodotto alimentare	Livelli massimi Somma di diossine e furani (OMS-PCDD/F-TEQ) (*)	Livelli massimi Somma di diossine, furani e PCB diossina-simili (OMS- PCDD/F-PCB-TEQ) (°)	Metodi di campionamento e criteri di rendimento per i me- todi di analisi
5.1.1. Carni e prodotti a base di carne (**)			Direttiva 2002/69/CE (****)
– di ruminanti (bovini, ovini)	3,0 pg/g grasso (***)	4,5 pg/g grasso (***)	
– di pollame e selvaggina d'allevamento	2,0 pg/g grasso (***)	4,0 pg/g grasso (***)	
– di suini	1,0 pg/g grasso (***)	1,5 pg/g grasso (***)	
5.1.2. Fegato e prodotti derivati da animali terrestri	6,0 pg/g grasso (***)	12,0 pg/g grasso (***)	
5.2. Muscolo di pesce e prodotti della pesca e loro derivati ad eccezione dell'anguilla (****), (*****)	4,0 pg/g peso fresco	8,0 pg/g peso fresco	Direttiva 2002/69/CE (****)
– Muscolo di anguilla (<i>Anguilla anguilla</i>) e pro- dotti derivati	4,0 pg/g peso fresco	12,0 pg/g peso fresco	
5.3. Latte (*****) e prodotti lattiero-caseari, com- preso il grasso butirrico	3,0 pg/g grasso (***)	6,0 pg/g grasso (***)	Direttiva 2002/69/CE (****)

Prodotto alimentare	Livelli massimi Somma di diossine e furani (OMS-PCDD/F-TEQ) (*)	Livelli massimi Somma di diossine, furani e PCB diossina-simili (OMS- PCDD/F-PCB-TEQ) (°)	Metodi di campionamento e criteri di rendimento per i me- todi di analisi
5.1.1. Carni e prodotti a base di carne (**)			Direttiva 2002/69/CE (****)
– di ruminanti (bovini, ovini)	3,0 pg/g grasso (***)	4,5 pg/g grasso (***)	
– di pollame e selvaggina d'allevamento	2,0 pg/g grasso (***)	4,0 pg/g grasso (***)	
– di suini	1,0 pg/g grasso (***)	1,5 pg/g grasso (***)	
5.1.2. Fegato e prodotti derivati da animali terrestri	6,0 pg/g grasso (***)	12,0 pg/g grasso (***)	
5.2. Muscolo di pesce e prodotti della pesca e loro derivati ad eccezione dell'anguilla (****), (*****)	4,0 pg/g peso fresco	8,0 pg/g peso fresco	Direttiva 2002/69/CE (****)
– Muscolo di anguilla (<i>Anguilla anguilla</i>) e pro- dotti derivati	4,0 pg/g peso fresco	12,0 pg/g peso fresco	
5.3. Latte (*****) e prodotti lattiero-caseari, com- preso il grasso butirrico	3,0 pg/g grasso (***)	6,0 pg/g grasso (***)	Direttiva 2002/69/CE (****)

* *Le concentrazioni upper bound vengono calcolate ipotizzando che tutti i valori dei vari congeneri inferiore al limite di determinazione siano pari al limite di determinazione.*

** *Carne di bovini, ovini, suini, pollame e selvaggina d'allevamento come da allegato 1 del regolamento CE 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, escluse le frattaglie commestibili di cui a tale allegato.*

*** *I livelli massimi non sono applicabili ai prodotti alimentari con un tenore di grasso <1%.*

**** *G.U. 209 del 06.08 2002 pag 5 Direttiva modificata da ultimo dalla direttiva*

2004/44/CE (GU L 113 del 20.04.2004, pag 17).

Muscolo di pesce e prodotti della pesca secondo quanto definito alle categorie a) b) c) d) e) f) dell'elenco che figura all'articolo 1 del regolamento (CE) n. 104/2000 del Consiglio 8GU L 17 del 21/1/2000 pag. 22. Regolamento modificato dall'atto di adesione del 2003). Il livello massimo si applica ai crostacei, escluse le carni scure del granchio e le carni della testa e del torace di aragosta e di analoghi grossi crostacei (Nephropidae Palinutidae), nonché ai cefalopodi senza visceri.

Se il pesce è destinato ad essere consumato intero, il livello massimo si applica all'intero pesci.

Latte, latte crudo, latte per la lavorazione di prodotti a base di latte e latte trattato termicamente di cui all'allegato I del regolamento CE 853/2004.

Uova di gallina e ovoprodotti di cui all'allegato I regolamento CE 853/2004.

Attualmente nessun livello massimo si applica ai cereali, alla frutta e agli ortaggi in quanto tali prodotti alimentari presentano generalmente bassi livelli di contaminazione e costituiscono un fattore che contribuisce solo marginalmente all'esposizione complessiva dell'uomo alle diossine. Poiché la contaminazione di alimenti quali carne, latte e uova è direttamente correlata alla contaminazione dei mangimi, è stato ritenuto indispensabile definire non soltanto un livello massimo di tollerabilità di diossine negli alimenti di origine animale ma anche misure volte a ridurre le emissioni nell'ambiente.

Le norme e i limiti per i PCB negli alimenti

Le stime dell'esposizione a diossine e PCB dioxin-like indicano che una parte considerevole della popolazione dell'Unione Europea assume tali sostanze con gli alimenti. Il 30 maggio 2001 il comitato scientifico per l'alimentazione umana (SCF) ha adottato un parere sulla valutazione del rischio da diossine e da PCBdl negli alimenti, basato su nuove informazioni scientifiche. Il SCF ha fissato una dose settimanale ammissibile per le diossine e i PCBdl pari a 14 pg (OMS) - equivalente di tossicità (TEQ) /kg di peso corporeo. Dati ribaditi nel rapporto EFSA 2004.

Il Regolamento (CE) n. 2375/2001 del 29 novembre 2001, recante modifica del regolamento (CE) n. 466/2001 della Commissione, definiva i tenori massimi di taluni contaminanti, tra cui diossine e furani, presenti nelle derrate alimentari. In tale regolamento esistevano livelli massimi solo per le diossine e i furani e non per i PCBdl, a causa della disponibilità di dati molto limitata. Il Regolamento (CE) n. 199/2006 del 03 Febbraio 2006 ha sostituito il summenzionato regolamento introducendo anche i limiti per i PCBdl, in caso di mancato rispetto delle disposizioni della normativa in vigore e qualora si riscontrino livelli di diossine eccedenti i livelli d'azione specificati nell'allegato I del Regolamento (CE) n. 199/2006 del 03 Febbraio 2006, gli Stati membri, in collaborazione con gli operatori: devono:

- a) avviare indagini per individuare la fonte di contaminazione;
- b) verificare la presenza di PCBdl.

Inoltre, in data 06 Febbraio 2006 la Commissione ha pubblicato una Rac-

comandazione relativamente alla riduzione della presenza di diossine, furani e PCB nei mangimi e negli alimenti, dove sono fissati valori massimi accettabili ancora più restrittivi rispetto al suddetto Regolamento.

Conclusioni

L'analisi dei problemi legati ai contaminanti ambientali persistenti quali Diossine, furani, PCBdl e la produzione di alimenti di origine animale, mette in evidenza come allo stato attuale sia impossibile produrre alimenti a "residuo zero".

Lo sforzo che si sta compiendo sia sul piano produttivo sia normativo è volto alla riduzione, nel breve periodo, della presenza nell'ambiente e negli alimenti dei medesimi.

Naturalmente la contaminazione degli alimenti da questi xenobiotici tossici, è considerato un forte problema di Salute Pubblica; pertanto sia l'Unione Europea sia numerosi organismi internazionali si sono attivati con un programma di monitoraggio dell'ambiente e degli alimenti. Questa azione permetterà un intervento tempestivo di sequestro e distruzione delle derrate alimentari che presenteranno livelli massimi di contaminazione superiore ai livelli massimi consentiti. I dati dei monitoraggi fino ad oggi riportati sui tessuti umani hanno messo in evidenza che i composti, 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8 PCDD, 1,2,3, 6, 7,8-Hx CDD, 2,3,4,7,8-PCDF, PCB 126 rappresentano l'80% del totale TEQ riscontrati e che la popolazione attualmente è sovraesposta con l'alimento a questi contaminanti essendo il limite di sicurezza stabilito dall'OMS pari a 14 pg/kg ed i valori medi riscontrati nella popolazione pari a 55-25 pg/kg.

Per il momento il suggerimento migliore per ridurre l'esposizione dell'uomo a queste sostanze è, ad oggi, l'adozione di un regime alimentare molto variato e povero di grassi animali.

Bibliografia

1. Ahlborg U.G., Becking G.C., Birnbaum L.S., Brouwer A., Derks H.J.G.M., Feeley M., Golor G., Hanberg A., Larsen J.C., Liem A.K.D., Safe S.H., Schlatter C., Waern F., Younes M., and E. Yrjanheikki, (1994). Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. Report on a WHO-ECEH and IPCS Consultation, December 1993. Chemosphere, 28, 1049-1067.
2. APAT (2005) Annuario dei dati ambientali, edizione 2004, maggio 2005, ISBN 88-448-0147-7
3. DETR, Compilation of EU Dioxin Exposure and Health Data. Task 3-Environmental Fate and Transport. European Commission DG Environment. European Commission (1996). European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. Wey Bridge, 24 Dec. Report.
4. EFSA, Colloquium on Dioxins, Furans and Dioxin-like PCBs, Brussels Belgium 28,29 June 105,(2004).
5. European Commission, (2000). Opinion of the SCF on the Risk Assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food. Adopted on 22 November.

6. Greenpeace (1993). Dioxin factories: a study of the creation and discharge of dioxins and other organochlorines from the production of PVC. Amsterdam, The Netherlands: Greenpeace.
7. HSDB Hazardous Substances Data Bank (on line). National Library of Medicine, Bethesda, MD. (www.toxnet.it)
8. IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Vol. 69, p. 33 (1997).
9. Istituto Superiore di Sanità: <http://www.iss.it/diossina/diossina.htm>. (1999).
10. Jana, N.R., Sarkar, S., Yonemoto, J., Tohyama, C., Sone, H. (1998). Strain differences in cytochrome P4501A1 e expression caused by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat liver: role of the aryl hydrocarbon receptor and its nuclear translocator. *Biochem Biophys Res Commun* 248:554-558
11. Müller H.E. (1997). The Risks of Dioxin to Human Health. In *What Risk?*, by Roger Bate (ed), Butterworth-Heinemann (1997).
12. NATO/CCMS (1988). International toxicity equivalency factors (I-TEF) method of risk assessment for complex mixtures of dioxin and related compounds, North Atlantic Treaty Organization, Committee on the Challenges of Modern Society, North Atlantic Treaty Organization, Brussels, Report no.176.
13. Needham L.L., Patterson D.G. Jr, Houk V.N. (1991). Levels of TCDD in selected human populations and their relevance to human risk assessment. *Banbury Report 35: Biological basis for risk assessment of dioxins and related compounds*. Cold Spring Harbor Press, 229-247.
14. Panebianco A., Ziino G., (2000). PCB, PCDD e PCDF nei prodotti di origine animale. *Atti giornata Nazionale di studi "Xenobiotici supertossici negli alimenti"* 40-61.
15. Strategia comunitaria sulle diossine, i furani e i bifenili policlorurati, Bruxelles 24.10 (2001).
16. Stringer, R.L., Costner, P. & Johnston, P.A. (1995). PVC manufacture as a source of PCDD/Fs. *Dioxin '95, Organohalogen Compounds*, 24:119-123.
17. Travis C. and A.D. Arms (1988). Bioconcentration of organics in beef, milk and vegetation. *Environ. Sci. Technol*, 22, 271-274.
18. U.S. E.P.A. Environmental Protection Agency (1994). Health assessment document for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. U.S. Environmental Protection Agency (EPA/600/BP-92/001a-c).
19. UE (2001) The European Dioxin Emission Inventory Stage II Volume 1 Report prepared for European Commission, Directorate General for Environment (DG ENV), Contract No.: 96/771/3040/DEB/E1, Contract period: 01.01.1998 31.12. 2000, Release date: December 2000.
20. Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T.C., Brunström B., Cook P., Feeley M., Giesy J., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S.W., Kubiak T., Larsen J.C., van Leeuwen F.X.R., Liem AKD, Nolt C, Peterson RE, Poellinger L, Safe S, Schrenk D, Tillitt D, Tysklind M, Wærn F, Younes M. and T Zacharewski (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, 66 PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives* 106,

775-792.

21. Regolamento (CE) n.199/2006 della Commissione del 03 Febbraio (2006). GUCE L 32/34 del 04/2/2006.
22. Raccomandazione della Commissione 6 Febbraio 2006 C235 (2006). GUCE L 42/46 del 14/2/2006.

ESPOSIZIONE A XENOBIOTICI E MODULAZIONE IMMUNITARIA

EXPOSURE TO XENOBIOTICS AND IMMUNOMODULATION

Cabassi Enrico¹, Valente Livia², Miduri Francesca¹

PAROLE CHIAVE:

contaminanti ambientali, fitofarmaci, immunotossicità, micotossine, xenobiotici.

KEY WORDS:

immunotoxicity, mycotoxins, pesticides, pollutants, xenobiotics.

Riassunto

Gli AA passano in rassegna gli effetti immunotossici indotti da xenobiotici di più frequente impatto ambientale o di utilizzo nel settore agro-zootecnico negli animali o riscontrati nell'uomo accidentalmente esposto a tali prodotti. Si soffermano sulla funzionalità immunitaria naturale e adattativa, nonché sul ruolo del sistema immunitario nel mantenere l'integrità delle funzioni organiche, del rinnovamento delle cellule e della loro proliferazione e differenziazione.

Sottolineano le prevedibili conseguenze negative che possono derivare dall'esposizione a tali inquinanti con la comparsa di fenomeni di immunodepressione e/o di immunostimolazione, che potenzialmente comportano maggiore suscettibilità alle malattie infettive, indebolimento della funzione riproduttiva, inadeguatezza nella risposta vaccinale e riduzione della produttività in campo zoeconomico. Illustrano, sulla base della loro esperienza, alcuni effetti immunosoppressivi riscontrati a livello di risposta cellulo-mediata in scrofe intossicate con aflatossina B1, con ocratossina A, durante la gravidanza e l'allattamento, nonché nella loro prole indirettamente esposta, e sulle *defaillances* immunitarie osservate in lattinzoli in corso di intossicazione con fumonisina B1.

Nel riferire sugli effetti immunomodulatori di glucocorticoidi adoperati in modo illecito in campo zootecnico, auspicano che alcuni test in uso per lo studio della funzionalità immunitaria possano trovare validità quali indicatori biologici nella sorveglianza sanitaria di animali sospetti di trattamenti farmacologici impropri.

¹Dipartimento di Salute Animale - Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria, Università degli Studi di Parma

²Consulente Servizio Veterinario dell'Ateneo di Parma per il Controllo del Benessere Animale
enrico.cabassi@unipr.it

Abstract

The authors report the immunotoxic effects induced by xenobiotics of the most frequent environmental impact or used in the agro-zootechnical field in animals or in humans accidentally exposed to such products.

They emphasize the natural and acquired immunitary function, besides the role of the immunitary system in maintaining the integrity of the organic functions, cellular generation, proliferation and differentiation.

They have underlined the foreseen and negative consequences deriving from exposure to such pollutants with the occurrence of immunosuppression and/or immunostimulation, potentially causing increased susceptibility to infection, reduction of reproductive function, inadequacy of vaccine reaction and reduction of zooeconomic productivity.

The authors, based on their experience, detail the immunosuppressive effects encountered at the cell-mediated level in sows intoxicated with aflatoxin B1 or ochratoxin A directly during pregnancy and lactation and in their indirectly exposed offspring, and in addition the immunitary alterations in growing piglets undergoing intoxication with fumonisin B1.

Referring to the immunomodulation of glucocorticoides illicitly practiced in the zootechnical field, the authors hope that immunological tests can be used as biological markers in safety control of animals suspected of not appropriate pharmacological treatments.

Introduzione

È noto che l'uomo, gli animali e l'ambiente, in cui essi vivono e di cui fanno parte, sono continuamente esposti a sostanze tossiche, comunemente definite xenobiotici, che esercitano effetti potenzialmente dannosi sugli organismi viventi, compromettendone lo stato di salute e di benessere, nonché, in termini zooeconomici, la loro produttività.

Oltre che di agenti biologici (virus, batteri, miceti, parassiti) per xenobiotici si intende un folto gruppo di sostanze chimiche, naturali e di sintesi, estranee all'organismo, comprendenti inquinanti atmosferici e ambientali, pesticidi, farmaci, metalli pesanti, tossici naturali, nanomateriali, etc., che nonostante la notevole differenza strutturale a livello molecolare interferiscono, attraverso meccanismi altrettanto diversi, con il sistema immunitario, producendo effetti comuni di compromissione dello stesso sistema: dal cambiamento della cellularità leucocitaria alle modificazioni ripartitive delle sottopopolazioni linfocitarie, dalla riduzione della resistenza dell'organismo alle alterazioni nelle risposte immunitarie specifiche.

La capacità di difendere l'organismo da xenobiotici potenzialmente dannosi presuppone la possibilità di riconoscere e discriminare ciò che è patogeno all'organismo e di rispondere ad esso in maniera da eliminare tale potere patogeno. In siffatto contesto la risposta immunitaria viene garantita dall'interazione tra numerose componenti individuali, cellulari e solubili, che agiscono sempre in reciproco rapporto, in accordo, in sinergia ed in conflitto tra loro. All'interno di tale dinamica, l'azione delle

diverse cellule è modulata non solo da componenti elaborate da differenti elementi cellulari appartenenti al sistema immunitario, ma anche da stimoli provenienti da altri sistemi fisiologici, soprattutto sistema nervoso ed endocrino, con i quali comunica attraverso mediatori solubili (neurotrasmettitori, ormoni, citochine) ad opera di recettori specifici comuni a questi sistemi. (35)

La funzione del sistema immunitario tende, quindi, a proteggere l'individualità e l'omeostasi dell'organismo, sia opponendosi all'invasione e intossicazione da parte di xenobiotici, sia reprimendo mutazioni e degenerazioni che potrebbero insorgere all'interno dell'organismo stesso.

In questa azione il sistema immunitario opera su due registri:

a) quello della risposta naturale o aspecifica, caratterizzato da meccanismi di reazione più primitivi, molto potenti e rapidi, che agiscono ad ampio spettro solo per grandi categorie;

b) quello della risposta specifica o adattativa, dove viene riconosciuto ciò che è estraneo attraverso l'attivazione delle componenti fagocitarie e dei diversi fattori sierici, tra cui principalmente le proteine del sistema complemento, caratterizzato da specificità e memoria nei confronti dell'antigene, con l'attivazione di meccanismi capaci di riconoscere e di reagire selettivamente solo verso lo specifico agente che ha innescato la reazione; i linfociti T e B sono i principali mediatori dell'immunità specifica. (17)

Il sistema immunitario rappresenta, quindi, un facile bersaglio potendo essere colpito sia direttamente e preferenzialmente a livello di organi linfoidi centrali o periferici, come pure secondariamente a seguito di lesioni in altri organi, che a loro volta possono coinvolgere il sistema immunitario, compromettendone la funzionalità e l'efficienza.

A seguito dell'esposizione prolungata a xenobiotici sono possibili alterazioni nei meccanismi della difesa, come pure possono insorgere rallentamenti o indebolimenti funzionali della risposta immunitaria, con potenziali implicazioni di sviluppare forme cliniche di malattie metaboliche, infettive e neoplastiche, nonché inadeguatezza nella risposta vaccinale, processi altrimenti controllabili da un sistema immunitario integralmente funzionante.

Si possono riscontrare anche tipologie di risposta immunostimolante, con quadri reattivi esagerati legati ad un'incongrua attivazione della funzione effettrice del sistema immunitario in risposta ad antigeni ambientali, dietetici, infestivi ed infettivi, farmacologici e perfino alle normali componenti tissutali dell'ospite, con comparsa di malattie autoimmuni.

È risaputo che l'animale immunocompromesso dimostra maggiore predisposizione soprattutto alle infezioni opportunistiche, definite come infezioni causate da microrganismi di bassa virulenza che compongono la normale microflora della cute e delle mucose o da microrganismi patogeni normalmente mantenuti in uno stato di latenza. Vari virus latenti, batteri, miceti e parassiti in conseguenza di un'alterata immunità cellulo-mediata e/o per una riduzione dei livelli di anticorpi funzionanti, oppure per compromissione della funzionalità dei macrofagi, si riattivano producendo una malattia localmente progressiva o disseminata, in cui i meccanismi di riconoscimento di ciò che è proprio vengono persi e le immunoglobuline o i recettori delle cellule T

vanno a reagire con antigeni endogeni, risultando processi di automantenimento della patologia legata all'interazione degli anticorpi con gli antigeni stessi. (23)

Nel contesto dell'immunomodulazione indotta da xenobiotici va segnalato inoltre che la componente genetica, con i suoi polimorfismi, rappresenta un importante fattore di suscettibilità individuale, che si combina talvolta con il fattore tossico esogeno, riuscendo a sovvertire la normale risposta immunitaria; fenomeno questo che si può riscontrare in corso di intossicazione da idrocarburi aromatici alogenati od anche per effetto di inquinanti particolati, che agendo come adiuvanti potenziano la risposta IgE ai comuni allergeni con conseguenti reazioni anafilattiche localizzate.

La finalità di questa pubblicazione è quella di fornire, sulla base dei dati della letteratura, ma anche sulla scorta di esperienze di Istituto, una breve rassegna circa le attuali conoscenze sull'immunotossicità indotta da alcuni xenobiotici (inquinanti atmosferici, ambientali, nanomateriali, fitofarmaci, micotossine, metalli pesanti, farmaci) a cui gli animali e l'uomo possono essere maggiormente esposti.

Inquinanti atmosferici ed ambientali

Diverse sono le situazioni di esposizione attraverso cui gli xenobiotici entrano nell'organismo; le principali vie sono l'inalatoria, l'orale e la transdermica.

Gli agenti inquinanti atmosferici entrano per inalazione, mentre per gli xenobiotici inquinanti l'acqua, gli alimenti o il suolo l'assunzione orale è la più importante via di esposizione.

Le difese dell'apparato respiratorio contro i gas e le particelle corpuscolate inalate dipendono da meccanismi chimico-fisici ed immunologici. (20)

I principali meccanismi immunologici coinvolgono le complesse interazioni tra i polimorfonucleati, i macrofagi alveolari e la loro capacità di fagocitare il materiale estraneo e di produrre citochine, le quali non solo agiscono localmente come mediatori flogistici, ma sono in grado di richiamare altre cellule nelle vie respiratorie che modulano la risposta immunitaria.

I principali xenobiotici responsabili dell'inquinamento atmosferico, che risultano immunotossici per le strutture dell'apparato respiratorio, sono i gas ossidanti, tra cui ricordiamo l'anidride solforosa (SO₂), l'ammoniaca (NH₃) di facile riscontro nei ricoveri di animali con scarsa ventilazione, il monossido di carbonio (CO), l'ozono (O₃) derivante soprattutto da inquinamento fotochimico, i prodotti di ossidazione dell'azoto (NO₂), gli idrocarburi policiclici, vari contaminanti corpuscolati (PTS, PM₁₀, PM_{2,5}) che, in rapporto alle concentrazioni raggiunte nell'aria atmosferica ed alle loro dimensioni, possono pervenire a differenti livelli della mucosa respiratoria.

Particolare rilevanza deve essere attribuita ai radicali liberi, molecole altamente instabili, che sono in grado di far perdere elettroni alle altre molecole, ossidandole. A livello di mucosa respiratoria i radicali liberi sono utilizzati dai macrofagi e dai polimorfonucleati durante i processi infiammatori, specialmente nelle forme batteriche, ma vengono prodotti anche in assenza di questi stimoli, contribuendo alla deformazione e distruzione delle cellule per danno di membrana, all'alterazione del sistema muco-ciliare e della matrice connettivale dell'interstizio; ne consegue rottura dell'equilibrio esistente tra le molecole ossidanti e molecole di difesa antios-

sidanti (α -tocoferolo, β -carotene, acido ascorbico, glutatione), localizzate a livello di membrana cellulare o con sede negli spazi intra od extracellulari, in associazione ad alcuni enzimi *scavengers*, quali catalasi, perossidasi, superossidodismutasi. Da segnalare, inoltre, che nel contesto del danno tissutale indotto dalla flogosi si libera acido arachidonico dalle membrane cellulari, il che comporta perossidazione lipidica con ulteriore formazione di radicali liberi.

Gli inquinanti con elevato potere ossidante sono in grado di determinare un abbassamento della soglia di reattività difensiva aspecifica a livello mucosale, indurre variazioni nella proliferazione delle cellule effettrici produttrici di citochine e di conseguenza possono modulare differenti risposte immunitarie dell'ospite.

È risaputo che l'esposizione ad inquinanti atmosferici, oltre a dar luogo a risposte immunodepressive, può scatenare reazioni allergiche per sensibilizzazione diretta o per azione adiuvante, oppure agire indirettamente sull'organo di shock, facilitando la comparsa di sintomi in soggetti precedentemente asintomatici. (14)

L'ossido di azoto (NO_2) e l'ozono (O_3) in prove sperimentali su topi hanno dimostrato un'azione tossica diretta sui macrofagi alveolari compromettendone le difese verso le infezioni. È stato evidenziato, inoltre, che l'esposizione ad inquinanti atmosferici è in grado di ridurre la risposta primaria e secondaria ad alcuni virus, di causare una *defaillance* dell'ipersensibilità ritardata e di inibire la risposta linfocitaria alle fitoagglutinine ed alla Con-A. Nel ratto è stata anche riscontrata una maggiore sensibilità al test di anafilassi cutanea passiva ad ovoalbumina.

Per quanto attiene l'assunzione alimentare di xenobiotici la superficie intestinale rappresenta un'ampia area di scambio con l'ambiente esterno. La mucosa intestinale, infatti, porta ad una grande varietà di contaminanti antigeniche che possono penetrare attraverso la lamina propria dell'intestino normale o alterato da patologie.

È intuitivo che in un simile contesto il sistema immunitario svolge un ruolo importante per la protezione dell'ospite, stimolando il tessuto linfatico associato all'intestino (il c.d. GALT - Gut-Associated Lymphoid Tissue - rappresentato dalle placche di Peyer, dalle cellule linfoidi della lamina propria e dai linfociti intraepiteliali) a processare gli antigeni che interagiscono con la mucosa intestinale e successivamente a diffondere le reazioni immunitarie.

È opportuno ricordare che il sistema linfoide intestinale ha un compito particolarmente impegnativo e più difficile, rispetto alle altre componenti linfatiche associate alle mucose: deve, infatti, distinguere non solo fra antigeni "self" e "non self", ma anche tra xenobiotici potenzialmente pericolosi e determinanti antigeniche alimentari generalmente innocue, cui è costantemente esposto.

Ne deriva che il sistema linfatico intestinale è in grado di attivare non solo una rapida ed efficace modulazione immunitaria contro gli xenobiotici potenzialmente pericolosi, ma per evitare reazioni dannose all'organismo è capace anche di stimolare meccanismi di immunosoppressione verso tali determinanti antigeniche non pericolose, selezionando specifiche popolazioni linfocitarie con peculiari espressioni di citochine, c.d. tolleranza immunitaria. (32)

Poche classi di xenobiotici ambientali sono state così studiate per gli effetti immunotossici come i cosiddetti composti idrocarburi ciclici alogenati, strutturalmente simili, divenuti ormai inquinanti ambientali ubiquitariamente diffusi. Essi

comprendono i bifenili policlorurati (PCB), i bifenili polibromurati (PBB), i dibenzofurani policlorurati (PCDF), nonché le diossine, che già in passato hanno dimostrato come gli organi del sistema immunitario siano i loro principali bersagli.

Si tratta di molecole di origine antropogenica caratterizzate da elevate lipofinità, semivolatilità, fortemente persistenti nell'ambiente, in grado di essere trasportate a lunghe distanze con tendenza alla bioconcentrazione; sul piano tossicologico manifestano effetti dermotossici, immunotossici, teratogeni e cancerogeni, evocano disturbi della funzionalità riproduttiva e alterazioni del sistema endocrino. (1)

È opportuno ricordare che mentre le diossine non vengono prodotte scientemente, ma sono sottoprodotti indesiderati di una serie di processi chimici e di combustione, i PCB, i PBB ed i composti furanici sono sostanze chimiche prodotte deliberatamente; da oltre venti anni né è vietato l'uso e la commercializzazione.

Sul piano immunotossicologico varie indagini sperimentali a seguito dell'esposizione a tali inquinanti hanno dimostrato fenomeni di immunodepressione, con quadri di ipoplasia timica, splenica ed involuzione di tutti i tessuti associati ai linfonodi, pancitopenia, cachessia e promozione oncogenica. Nel contesto sperimentale, studi comparati hanno evidenziato che gli animali esposti ai PCB ed alle diossine manifestano reazioni immunotossiche molto simili tra loro. Quanto a sensibilità al tossico si riscontrano differenze di specie, nella stessa specie, nonché in rapporto all'età ed al sesso, verosimilmente per effetto del polimorfismo genetico Ah recettoriale. (40)

Studi sulla resistenza dell'organismo a seguito dell'esposizione protratta a composti alogenati ciclici indicano un indebolimento delle difese organiche, come dimostrato dalla maggiore suscettibilità delle anatre all'epatite virale, del topo al virus Cocksackie B3, alla Salmonella typhimurium ed alla Trichinella spiralis, etc.

Anche in campo umano a seguito dell'esposizione a tali inquinanti sono stati segnalati quadri di indebolimento della risposta immunitaria, a cui non è stato possibile finora associare alterazioni specifiche delle funzioni difensive. (16)

Per quanto attiene ai PBB, le indagini condotte in una fattoria del Michigan a seguito di una prolungata esposizione di animali e di persone al tossico non hanno portato a particolari manifestazioni sintomatiche, pur in presenza di una potente tendenza a quadri di linfocitopenia, incremento delle IgA, IgG e del complemento (C3). Qualche anno più tardi, nelle persone immunocompromesse si è rilevata una maggior (10,7 %) incidenza di neoplasie. A Taiwan, in soggetti accidentalmente intossicati da bifenili alogenati si sono osservate alterazioni immunitarie ad oltre un anno dall'episodio acuto, alterazioni rappresentate da riduzione delle concentrazioni sieriche di IgM e di IgA, decremento dei linfociti T, in particolare dei CD4, con CD8 e linfociti B nella norma. È stata rilevata, inoltre, una riduzione dell'ipersensibilità ritardata ed un aumento della risposta linfocitaria alla maggior parte dei mitogeni.

I bambini Inuit, le cui madri sono state accidentalmente esposte a idrocarburi ciclici alogenati durante la gravidanza e l'allattamento, hanno dimostrato nell'80% dei casi di soffrire nei primi anni di vita di otiti infettive all'orecchio medio e nel 60% dei casi di infezioni polmonari, in conseguenza delle deficienze immunitarie indotte da tali contaminanti ambientali. (18)

Gli effetti immunotossici indotti dalle diossine, a seguito di ricerche condot-

te sperimentalmente su primati non umani, cavie, ratti, topi, polli, hanno evidenziato effetti depressivi dell'immunocompetenza con precoci riscontri di ipoplasia timica, mirata alle cellule epiteliali della corticale per effetto dei recettori Ah, maggior suscettibilità alle infezioni, riduzione dell'attività fagocitaria e di quella delle cellule NK.

Circa l'immunotossicità delle diossine in campo umano non esistono attualmente dati che riportino processi involutivi del timo per effetto delle diossine, anche se Vos et al. (1997/98), sulla base di un modello di trapianto di timo umano fetale nel ratto intossicato, ipotizzano che la sensibilità timica tra le due specie sia compatibile. Il meccanismo dell'immunotossicità da diossine a livello timico sembrerebbe legato all'incremento della fosforilazione ossidativa della tiroxina dei linfociti B, mentre verrebbe ridotta l'attività citotossica dei linfociti T, in associazione al forte incremento di fenomeni apoptotici dei timociti. Sempre a livello umano a seguito dell'intossicazione protratta da diossina alcuni ricercatori hanno osservato attivazione della proliferazione linfocitaria ai mitogeni, nonché quadri di linfocitosi nei bambini di Seveso esposti al tossico, comparativamente ad altri soggetti di controllo. (24)

Se alcuni ricercatori in operai esposti hanno evidenziato una riduzione percentuale dei linfociti T CD4, altri ne hanno rilevato un leggero incremento. In prove comparative tra soggetti esposti ed altri non intossicati non si sono osservate differenze ripartitive nell'ambito dei due gruppi per quanto attiene le sottopopolazioni linfocitarie ed anche il numero delle cellule NK non ha mostrato variazioni. Anche la valutazione delle Ig sieriche e del complemento non ha rivelato significative differenze nei valori conseguiti.

Tutti i ricercatori concordano nel definire il periodo perinatale il momento di maggiore sensibilità immunotossica, sia a livello umano che animale.

I dati bibliografici finora esistenti in materia di immunotossicità indotta dalla diossina in campo umano non sono molto convincenti, in ragione delle grandi differenze, della non omogeneità di risultati conseguiti e del carattere sovente marginale delle variazioni osservate. (24)

Immunotossicità da nanomateriali

È noto che le conoscenze scientifiche servono a produrre beni esistenti in natura o a trasformare beni esistenti in natura o a produrre beni che in natura non esistono. È quest'ultimo il caso dei nanomateriali (nanotubi, fullereni, *quantum dots*), materiali di derivazione sia organica che inorganica, dalle singolari proprietà strutturali, le cui dimensioni sono portate su scala nanoscopica, mantenendo però immutata la loro composizione chimica; sono di grande utilizzo tecnico-industriale come catalizzatori, cosmetici, vernici, oppure per aumentare la resistenza di materiali preesistenti; coinvolgono potenzialmente tutti i settori dell'economia, con larga applicazione in ogni campo, anche in quello medico-veterinario nell'ambito della diagnostica, nel trattamento di alcune malattie, nel controllo degli alimenti, etc.

In merito ai loro effetti immunotossici, le esperienze preliminari finora condotte, non molto numerose per la verità, sembrano esprimere, seppur con qualche perplessità, un giudizio di non pericolosità di tali materiali per la salute umana ed

animale.

Il vero problema di partenza, però, è che non conosciamo realmente ancora ciò che accade nell'organismo di fronte a tali materiali nanostrutturati accumulatisi negli organi e nei tessuti vitali; conosciamo molto bene invece gli effetti dei medesimi materiali in organi e tessuti dove sono stati riscontrati in forma normale e quindi con dimensioni maggiori. Alcuni ricercatori ricordano la necessità di prestare attenzione a questi nanotubi e fullereni, che oggi sono parte integrante del nostro sistema di vita, prima che possano diventare un vero e proprio problema di impatto ambientale.

Va sottolineato che prove sperimentali con nanomateriali hanno evidenziato processi genotossici e di cancerogenesi polmonare, quest'ultimo riscontro è stato possibile osservarlo solo nei ratti e non in hamster e topi tenuti nelle medesime condizioni di esposizione cronica. (5)

Immunotossicità da fitofarmaci

Accanto alla patologia acuta connessa ad incidenti o a mancate precauzioni prese nella loro utilizzazione, si è andata sempre più sviluppando una patologia cronica da bioaccumulo di fitofarmaci.

Per fitofarmaci si intendono dei presidi sanitari derivati da principi attivi naturali, di sintesi o di biosintesi, a diffusione ambientale, utilizzati in campo agricolo e domestico contro gli animali dannosi (insetti, acari, nematodi, molluschi, roditori, etc.), contro le malattie fungine degli animali e delle piante e contro le piante infestanti.

Alcune categorie di fitofarmaci già in passato hanno mostrato la loro tossicità per il sistema immunitario, manifestando prevalentemente riduzione dell'immunocompetenza, con quadri istolesivi degli organi linfoidi centrali e periferici, nonché alterazioni della risposta umorale e cellulare con meccanismi riportabili ad un'azione diretta, mirata alla produzione anticorpale, della citolisi cellulo-mediata di elementi cellulari che producono mediatori di tali funzioni, oppure in forma indiretta intervenendo sul sistema immunitario mediante effetti tossici generalizzati.

Talvolta i fitofarmaci sono stati coinvolti in processi di immunopotenziamento con reazioni di ipersensibilità immediata da contatto, sia nell'uomo che negli animali.

a) Insetticidi Per quanto attiene gli effetti immunotossici indotti dagli insetticidi organofosforati a seguito di una prolungata esposizione a basse dosi e in differenti contesti, essi sono caratterizzati prevalentemente da processi immunosoppressivi con ipoplasia ed ipotrofia delle strutture linfatiche centrali, ma anche periferiche, con quadri di linfocitopenia ed alterata ripartizione delle sottopopolazioni, diminuzione dei livelli sierici di immunoglobuline, depressione in vitro della risposta immunoproliferativa a fitogeni, indebolimento della chemiotassi, dell'adesività e dell'attività fagocitaria dei polimorfonucleati e dei monociti. (28)

Alla luce di queste alterazioni immunologiche, evidenziate in corso di protratta esposizione a esteri fosforici, hanno fatto riscontro in campo umano ed animale una maggiore suscettibilità ad infezioni virali, batteriche e parassitarie, unitamente ad

un incremento di mortalità neonatale (nel topo) e di processi neoplastici (nell'uomo e nel ratto).

Per quanto attiene i meccanismi molecolari immunotossici degli esteri fosforici si ipotizza che l'azione deprimente l'attività fagocitaria dei polimorfonucleati sia dovuta direttamente all'acetilcolina, capace di intervenire nella modulazione del contenuto intracellulare di cAMP e cGMP, mentre l'effetto sui linfociti T, sarebbe riconducibile ad un'azione mirata del neurotrasmettitore sulla membrana cellulare con conseguente riduzione dei recettori. (2)

Galloway ed Handy (2003) ritengono che l'effetto immunosoppressivo di alcuni esteri fosforici (chlorpyrifos, diazinone, malathion, parathion), oltre che alla funzione colinergica immediata, sarebbe legato all'azione inibente delle serine-proteasi e delle esterasi di membrana, enzimi di vitale importanza per la funzionalità immunitaria, nel contesto dell'attività del complemento e del sistema trombina-plasmina. Si verrebbero a creare così alterazioni nell'assetto morfofunzionale degli organi linfoidi e conseguentemente nel controllo della modulazione proliferativa delle cellule effettrici, con implicazioni quasi sempre riduttive.

Per quanto attiene gli aspetti immunotossici con reazioni di ipersensibilità immediata da fitofarmaci organofosforici è stato osservato che topi, cui era stato somministrato per via intraperitoneale malathion, hanno mostrato elevati livelli di IgE nel siero, senza però poter dimostrare la produzione di anticorpi a seguito dell'applicazione dello stesso composto. Reazioni di ipersensibilità immediata sono state osservate nell'uomo a seguito di esposizione acuta con manifestazioni asmatiche, positività al patch test, orticaria, nonché dermatiti da contatto, per altro riscontrate anche nel cane a seguito dell'utilizzo di collare antiparassitario.

In letteratura viene anche segnalato che l'esposizione acuta a malathion induce degranulazione dei mastociti peritoneali ed aumenta la fagocitosi macrofagica, con potenziale incremento delle funzioni leucocitarie e conseguente aumento non specifico della reazione immunitaria.

I carbammati eterociclici dotati di proprietà insetticida, com'è noto, agiscono nella stessa maniera dei composti organofosforati, ma con un legame di inibizione neurogiunzionale della colinesterasi meno duraturo.

Dal punto di vista immunotossicologico, a seguito del loro uso prolungato a basse dosi negli animali di laboratorio, sono stati rilevati effetti depressori della risposta immunitaria umorale e cellulare ed in alcuni casi quadri di ipoplasia timica, con particolare deplezione dei linfociti CD4 e CD8, congiuntamente ad una soppressione dell'attività delle cellule NK e riduzione della fagocitosi granulocitaria. (12)

Nel contesto dei fitofarmaci insetticidi un gruppo di composti, gli idrocaburi aromatici clorurati, detti anche pesticidi organoclorurati (aldrin, clordano, DDT, dieldrin, lindano, etc.), che furono principalmente usati negli anni '50 e '60, dopo di che il loro utilizzo divenne sempre meno frequente, per effetto della loro azione inquinante legata alla capacità di accumularsi nel suolo e nelle acque e di conseguenza lungo tutta la catena alimentare, con particolare concentrazione a livello del tessuto adiposo degli animali esposti.

A causa della loro presenza pressoché ubiquitaria, dal punto di vista immunotossicologico rappresentano un gruppo molto importante per le manifestazioni

immunosoppressive che sono in grado di indurre a livello cellulare ed umorale, con riduzione dei valori di IgM ed IgG, quantomeno nei polli, della chemiotassi e della micro e macrofagocitosi, manifestazioni che comportano generalmente un indebolimento delle resistenze difensive nei confronti delle infezioni batteriche.

A seguito della somministrazione orale di BHC e di DDT nel topo si è rilevato un decremento dell'attività fagocitaria dei leucociti, in associazione ad un'accreciuta mortalità dopo infezione con *Listeria monocytogenes*. (6)

Sempre in animali da esperimento è stato inoltre dimostrato che l'esposizione a tali composti è in grado di ridurre la risposta vaccinale a virus e di incrementare la sensibilità al test di anafilassi cutanea passiva ad ovoalbumina.

Ancor più note al riguardo le osservazioni fatte sui lavoratori esposti a tali contaminanti e soprattutto viene ricordata l'epidemia dovuta a morbillivirus che ha decimato più dei due terzi delle foche del Mare del Nord alla fine degli anni '80, ipotizzata come conseguenza probabile del grave inquinamento chimico da pesticidi organoclorurati delle acque marine di quell'area.

b) Erbicidi e dissecanti Si tratta di composti chimici diversi tra loro per composizione e grado di tossicità di larghissimo impiego per distruggere le piante infestanti.

Alcuni di questi, per esposizione ad alte dosi e prolungate nel tempo sono risultati immunotossici e responsabili di cancerogenicità per gli animali di laboratorio e per l'uomo. (3)

Gli erbicidi derivati dagli acidi fenossicarbossilici in indagini sperimentali hanno dimostrato di possedere effetti mielotossici, in grado di alterare le capacità differenziali delle cellule linfoidi provenienti dal midollo osseo, in associazione a forti potenzialità cancerogene a carico dei tessuti molli e dell'apparato emolinfopoietico; quest'ultima evenienza è stata segnalata anche in campo umano, a seguito di indagini epidemiologiche retrospettive, condotte per valutare gli indizi disponibili sui rischi di cancro in relazione all'esposizione ai fitofarmaci.

In operatori esposti ad erbicidi clorofenossilici si sono segnalate dermatiti da contatto, conseguenza di fenomeni di ipersensibilità cellulo-mediata. Potenzialità cancerogene a carico dell'apparato linfatico, ed anche in altri organi, sono state osservate nell'uomo in seguito all'esposizione prolungata a composti derivati delle triazine, erbicidi di scarsa solubilità, di largo impiego e diffusione ambientale. Sul piano immunotossicologico in letteratura sono riportati fenomeni di immunodepressione nella componente cellulo-mediata ed in quella umorale, con tendenza alla linfocitopenia, riduzione dell'attività fagocitaria, caratteristiche verosimilmente frutto delle interazioni negative che l'atrazina svolge nei confronti di prolattina e/o tiroxina, ormoni che rivestono un'importante funzione modulatrice della risposta immunitaria. (37)

Effetti di ipersensibilità da contatto locale sono stati osservati in animali di laboratorio esposti in forma protratta all'azione di fitoregolatori quali la ciclotreximide e l'idrazide maleica, come pure a seguito di piccole dosi di composti bipiridilici (paraquat), verosimilmente quale conseguenza della formazione di radicali anionici superossidi.

c) Anticrittogamici o fungicidi Gli anticrittogamici o fungicidi, come altre classi di fitofarmaci, sono rappresentati da un gruppo eterogeneo di composti chimici

usati per combattere le malattie fungine delle piante, delle sementi e dei prodotti ortofrutticoli. Non molti composti appartenenti a questa classe sono stati studiati dal punto di vista immunotossicologico; le ricerche riguardanti il gruppo dei ditiocarbammati, quello dei derivati clorobenzolici ed il pentaclorofenolo hanno dato luogo a risultati non sempre concordanti, vuoi per diversità dei composti, della difficoltà di valutazione dei differenti test utilizzati, delle modalità di impiego dei prodotti, dai dosaggi e dai tempi di esposizione.

In soggetti professionalmente esposti a polveri aerodisperse di ditiocarbammati di Zn e Mn (Mancozeb*), in comparazione a persone di controllo, sono stati rimarcati quadri di immunostimolazione con dermatiti da contatto, neutrofilia, eosinofilia, incrementi sia numerici che percentuali di linfociti B e di CD3, riduzione percentuale di macrofagi, in associazione a incrementi della risposta proliferativa a fitogeni (PHA e anticorpi anti-CD3) ed alla produzione di IL-2, nonché riduzione di TNF- α ; senza differenze significative il confronto dei valori di IL-4, γ IFN. (12)

Per contro, indagini condotte su soggetti esposti ad altro composto ditiocarbammato contenente nella molecola Na come catione metallico, si è riscontrato un orientamento immunodepressivo con riduzione dei CD3, CD4, CD20 unitamente ad un incremento dei linfociti T citotossici. (36)

Anche nell'esposizione all'esaclorofene ed al pentaclorofenolo sembrano individuarsi tendenze all'immunosoppressione, riscontrandosi decremento delle sottopopolazioni T helper, CD4 e CD29, incremento dei linfociti con marcatore superficiale CD25 e forte contenimento della risposta proliferativa a fitogeni (PHA e anticorpi anti-CD3).

Immunotossicità da metalli

Il sistema immunitario da molti sperimentatori viene considerato un organo critico per l'esposizione a metalli in quanto gli effetti a suo carico probabilmente precedono quelli alterativi precoci, molto più noti.

Numerosi sono i metalli in grado di evocare effetti immunotossici (Al, As, Be, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Hg, Ni, Pb, Se, Su, Te, Va, Zn, etc.) mediante l'azione diretta del metallo libero su membrane o altri organuli delle componenti immunitarie, nonché attraverso l'intervento catalizzatore o inibente di numerose reazioni enzimatiche essenziali al metabolismo cellulare e quindi interferendo sulla risposta immunitaria nelle sue varie espressioni.

Nella considerazione generale dell'immunotossicità dei metalli, torna utile segnalare che molti metalli a basse concentrazioni di esposizione per lo più manifestano effetti di immunopotenziamento, mentre dosaggi elevati evidenziano fenomeni di immunosoppressione, soprattutto per alcuni metalli pesanti quali Cd, Hg e Pb, legati in parte alla loro stessa azione citotossica, con induzione all'apoptosi e/o alla necrosi delle cellule del sistema immunitario, cui consegue un indebolimento delle resistenze alle infezioni. (25)

I soggetti esposti a basse dosi di Hg e Au notoriamente inducono glomerulonefriti immunomediata, con una fase iniziale di reattività contro la membrana basale glomerulare seguita da depositi mesangiali, cui fa seguito iperimmunoglobulinemia

con reattività antimolecolare. Prove sperimentali hanno anche evidenziato che basse concentrazioni di sali di mercurio tendono ad aumentare la sopravvivenza dei linfociti T attivati, ritardando i processi apoptotici. Analoghi riscontri di rallentamento apoptotico si sono osservati a carico di neutrofili umani esposti a deboli livelli di mercurio. Queste indagini fanno ipotizzare che basse concentrazioni di mercurio possano evocare accumuli eccessivi di cellule immunitarie destinate a morte spontanea, contribuendo così all'insorgenza di processi autoimmuni. (6)

Diversi metalli (Ca, Cr, Ni, Be, Fe) interagiscono con le cellule immuno-competenti e portano a reazioni di ipersensibilità immediata quali riniti, anafilassi, asma. Gli stessi metalli, unitamente al Hg, sono conosciuti anche per la loro capacità immunotossica caratterizzata da manifestazioni di ipersensibilità ritardata, clinicamente corrispondente alle c.d. dermatiti da contatto riscontrabili in campo umano e animale.

A diversi metalli viene riconosciuto anche un effetto immunodepressore e conseguentemente una maggior suscettibilità alle patologie infettive come in corso di intossicazione accidentale o sperimentale, da Va, Pb, As, Cd.

Immunotossicità da micotossine

Le micotossine sono piccole molecole tossiche (P.M.<1000) derivanti dal metabolismo secondario di alcuni funghi, appartenenti alle specie *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, agenti di malattie delle piante o di ammuffimento di derrate alimentari, che ingerite dall'uomo e dagli animali, sono causa di intossicazioni alimentari note come micotossicosi.

Sono poco solubili nell'acqua e difficilmente metabolizzabili dagli organismi viventi. In particolare per la loro struttura chimica, le micotossine sono molto stabili all'acidità e soprattutto al calore; le aflatossine, per esempio, resistono a 250°C e questa stabilità rende la loro eliminazione e, in conseguenza la decontaminazione delle derrate alimentari, molto problematica.

Le micotossine più note e studiate sono: aflatossina B1 (AB1), ocratossina A (OTA), fumonisin B1 (FB1), zearalenone (ZEN), deossinivalenolo (DON) e tos-sina T2. I loro principali effetti tossici riguardano la potenziale attività cancerogena, genotossica, teratogena ed immunosoppressiva; sono stati osservati anche quadri di ipersensibilità con fenomeni allergici ad opera di AFB1 e T2. (4, 11, 15)

a) Quasi tutti i vertebrati risultano sensibili all'azione tossica dell'aflatossina B1 (AB1). Le azioni immunotossiche si possono riassumere in un processo di immunodepressione che coinvolge sia la risposta immunitaria cellulare che quella umorale, con accelerazione involutiva del timo, perdita di timociti corticali, di linfociti T CD4, limitazione nella risposta cellulosa-mediata, riduzione dell'attività motoria e fagocitaria di monociti e di granulociti, indebolimento della funzione del complemento (C4), minor produzione di γ -interferone, di IL2 e di alcune classi di immunoglobuline (IgG e IgA) ma non di IgM, decremento della risposta linfoproliferativa a fitogeni e scarsa efficienza nella produzione di anioni superossido dopo stimolazione dei monociti. (31, 33)

Ricerche da noi condotte su scrofe gravide intossicate con AB1 e aflatossi-

na G1 (AG1), singolarmente impiegate (800 ppb) o in associazione (AB1 400 ppb + AG1 400 ppb), hanno evidenziato sul piano immunotossicologico, quantomeno in vitro, alterazioni nei parametri immunitari saggiati, con riduzione della risposta linfoproliferativa ai fitogeni e minor capacità da parte dei macrofagi di attivare la produzione di anione superossido. Accanto a questi effetti di immunotossicosi diretta, sono state svolte anche indagini di immunotossicità indiretta, per valutare il comportamento della risposta immunitaria nella prole nata dalle scrofe intossicate. Nel computo delle risultanze acquisite si è riscontrata riduzione chemiotattica verso l'E. coli da parte dei neutrofili in associazione al decremento dell'attività linfoproliferativa a mitogeni fitoemoagglutinanti ed a concanavallina A e riduzioni nella produzione di ioni superossidi da parte dei macrofagi opportunamente studiati in vitro. (38, 39)

Da segnalare inoltre che nei suinetti nati da scrofe AB1 intossicate si sono evidenziate deficienze di Zn plasmatico, unitamente ad indebolimento della timulina, l'ormone che richiede Zn per essere biologicamente attivo. In vitro poi si è osservato che l'aggiunta di Zn al plasma di suinetti intossicati accelera il processo di attivazione della timulina, lasciando presupporre che la carenza di Zn possa ancor più aggravare il processo immunodepressivo svolto dalla AB1. (30)

In altre nostre esperienze di aflatossicosi abbiamo condotto indagini sperimentali su scrofe per valutare la risposta immunitarie cellulomediata in corso di supplementazione di vitamine A ed E ad un mangime contaminato da 300 ppb di AB1, somministrato durante la gestazione e la lattazione. Per quanto attiene il comportamento delle sottopopolazioni linfocitarie preposte alla risposta immunitaria cellulomediata, si è potuto osservare nelle scrofe intossicate, senza supplementazione vitaminica, un andamento decrescente dei linfociti T helper, con accentuazione del fenomeno col protrarsi dell'intossicazione. (26)

Nelle scrofe intossicate, ma con una dieta ricca di vitamine A ed E, i risultati osservati non hanno evidenziato diversità di comportamento nelle sottopopolazioni linfocitarie T helper e T citotossici, nella popolazione fagocitaria (CD14), nei linfociti B maturi (CD21), nel rapporto CD4/CD8, nonché nella c.d. popolazione linfocitaria di difesa aspecifica ($CD\gamma\sigma$), rispetto a quelli ottenuti nelle scrofe di controllo non intossicate. (7)

La risposta immunitaria nei suinetti nati da scrofe intossicate con aflatossine in gravidanza e lattazione, con e senza supplementazione di vitamine A ed E, hanno messo in evidenza che non esistono differenze significative tra i soggetti dei tre gruppi in esame nei primi giorni di vita, mentre dopo tre settimane nei suinetti indirettamente intossicati si sono rilevati quadri di significativa riduzione numerica e percentuale dei linfociti T CD4 e CD8, CD21 e $CD\gamma\sigma$, dimostrando che il fattore causale dell'immunodepressione trova potenziale ragione nell'assunzione crescente di aflatossine M1 e M2, mediante il latte materno contaminato (rispettivamente 277 ng/l di M1 e 73 ng/l di M2 al 3° giorno di lattazione; 77ng/l di M1 e 22 ng/l di M2 al 23° giorno), senza trarre alcun beneficio dalla supplementazione vitaminica materna. (8)

b) L'attività immunotossica dell'ocratossina A (OTA) è stata studiata principalmente nel topo, nel ratto e nel pollo con quadri di linfocitopenia, deplezione degli organi linfoidi centrali, indebolimento delle difese organiche nei confronti di agenti infettivi, ridotta chemiotassi e fagocitosi, decremento dei livelli plasmatici di

immunoglobuline, etc.

Nel suino con trattamenti subcronici con OTA sono stati segnalati effetti immunosoppressivi caratterizzati da leucocitopenia, aumento dei fenomeni di apoptosi dei fagociti, incremento della produzione di ROS nel sangue, unitamente ad alterazioni nella ripartizione delle sottopopolazioni linfocitarie.

Sulla base delle nostre esperienze in scrofe direttamente intossicate con OTA durante il periodo di gravidanza e lattazione, come pure nella loro prole indirettamente esposta, si è osservato che:

1) la somministrazione di 160 ppb di OTA nella dieta non determina modificazioni nell'assetto immunitario morfofunzionale, rispetto a scrofe di controllo non intossicate;

2) la somministrazione di 500 ppb di OTA sempre nella razione alimentare di scrofe, con o senza supplementazione di vitamine A ed E, quali fattori protettivo-detossificanti, conferma il riscontro di lesioni tubulonefrosiche focali, senza però rivelare disfunzioni significative nei parametri immunitari presi in esame e riguardanti le sottopopolazioni linfocitarie T e le componenti mononucleate espresse da CD21 e CD14 (10). Anche i suinetti nati dalle scrofe intossicate con dieta supplementata o meno da vitamine A ed E, non hanno manifestato alterazioni particolari sul piano morfologico, né su quello immunitario. (9)

c) Le fumonisine sono una famiglia di micotossine citotossiche e carcinogenetiche prodotte dai miceti del genere *Fusarium*, specie che attaccano facilmente le coltivazioni di mais alle nostre latitudini durante le pratiche colturali, allorché la pianta è in fase di crescita.

La fumonisina B1 (FB1) induce effetti immunodeprimenti, accelerando i fenomeni apoptotici a livello epatico e renale, incrementa la produzione di TNF α , ma non sembra interferire sull'interleuchina 1 α e neppure sul γ interferone. Nel suino modifica i livelli di produzione di IL-4 e di IL-10, riduce l'attività macrofagica e sembra indebolire la produzione anticorpale specifica in alcuni trattamenti vaccinali. (15)

Nostre indagini su lattonzoli sottoposti a sperimentazione per 35 giorni con dieta contenente 30 ppm di FB1 associata o meno all'1% di carbone attivo, hanno messo in evidenza gravi alterazioni nella risposta immunitaria cellulo-mediata con forte decremento percentuale e ripartitivo dei linfociti T CD4 e CD8, valore che si è accentuato ancor più nei soggetti che hanno assunto carbone attivo. Anche le popolazioni micro e macrofagiche nei lattonzoli trattati, in comparazione dei soggetti di controllo, hanno mostrato quadri di immunodeficienza con decrementi del 50 ad oltre il 70% dei livelli di espressione immunitaria CD14. (34)

Immunotossicità da farmaci

Quasi tutti i farmaci possiedono un certo grado di attività immunomodulatoria, attività a volte espressamente voluta o intrinsecamente compatibile con le caratteristiche terapeutiche, grado che si sviluppa con una modulazione in direzioni opposte, configuranti o una deficienza nella risposta immune o un suo incremento, cui possono seguire manifestazioni allergiche o autoimmuni. (19)

Dal punto di vista immunosoppressivo vanno menzionati i farmaci citotossi-

ci, antitumorali (ciclofosfamide, tezotipirina, etc.), le ciclosporine, oggi largamente utilizzate in campo umano per la prevenzione del rigetto di organi trapiantati ed in alcune malattie autoimmuni per la loro capacità altamente selettiva di inibizione dei linfociti T helper senza essere citotossiche o mielotossiche, ed ancora i cortisonici, la cui attività è volta alla riduzione della risposta e produzione dei linfociti killer, della fagocitosi e della chemiotassi.

Tra i farmaci ad azione immunodepressiva vanno ancora ricordati gli antinfiammatori soprattutto non steroidei (FANS), per la loro inibizione della sintesi delle prostaglandine, unitamente ad un debole effetto inibente sulla sintesi dei leucotrieni, dell'aggregazione piastrinica, del sistema del complemento e della fagocitosi, etc.

Per quanto attiene l'immunostimolazione numerosi sono i farmaci che possono dar luogo a reazioni avverse di sensibilizzazione, sia agendo come antigeni completi ad alto peso molecolare, quali polipeptidi, insulina, estrogeni, sia operando in qualità di antigeni incompleti (apteni) a basso peso molecolare, come è il caso della maggior parte dei farmaci in uso quali chemioantibiotici (penicilline naturali e semisintetiche, cefalosporine, sulfamidici, tetraciline, etc.), anestetici, miorilassanti, fenotiazinici, etc. (6)

In nostre recenti ricerche, volte a valutare il comportamento delle cellule effettrici e regolatrici della risposta immunitaria, in seguito a somministrazione per 30 giorni di desametasone a bassissimi dosaggi in vitelli in fase di finissaggio (intervento talvolta praticato in modo fraudolento nell'allevamento dei vitelli a carne bianca), si è osservato nei soggetti trattati con il farmaco glucoattivo un rialzo costante ed indicativo nella conta leucocitaria, accompagnato da un elevato incremento della componente neutrofila in associazione ad una significativa linfocitopenia, con conseguente alterato rapporto leucociti/linfociti.

L'analisi citofluorimetrica ha poi mostrato differenze statisticamente indicative nella ripartizione di alcune sottopopolazioni linfocitarie: diminuzione della componente citotossica, dei linfociti B ed una debole tendenza all'aumento dei CD4 nelle fasi precoci (prima settimana) del trattamento. (29)

Circa l'utilizzo di anabolizzanti quali promotori di crescita degli animali da carne, i dati della letteratura riconoscono agli estrogeni effetti immunostimolatori, mentre agli androgeni ed ai progestinici vengono assegnate funzioni immunodepressivi. (1, 21, 27)

In campo zootecnico, nonostante i divieti, continua in modo fraudolento l'utilizzo di ormoni a scopo auxinico, con preoccupazione da parte delle autorità sanitarie per i potenziali rischi cui potrebbe andare incontro il consumatore per effetto di residui ormonali nelle carni degli animali trattati. In un simile contesto, potrebbe essere interessante ed utilmente pratico determinare il comportamento di alcuni parametri immunitari (conta e differenziamento dei leucociti, valutazione di alcune sottopopolazioni linfocitarie T e della componente B) per fornire indizi plausibili, potenzialmente indicativi di interventi illeciti con xenobiotici farmacologici sugli animali allevati in produzione zoeconomica.

Conclusioni

Le interazioni tra xenobiotici e immunomodulazione rappresentano certamente una problematica di grande interesse ed attualità. Sempre più numerose, infatti, sono in letteratura le segnalazioni di sostanze chimiche in grado di compromettere la risposta immunitaria come conseguenza di un'azione diretta o indiretta del composto stesso, di suoi metaboliti, anche senza apparenti manifestazioni cliniche in organi o apparati.

Richiamare l'attenzione su tali sostanze chimiche, tenuto in considerazione l'importante ruolo svolto dal sistema immunitario nel mantenere l'integrità delle funzioni organiche, del rinnovamento delle cellule, della loro proliferazione e differenziazione, è più che comprensibile; serve a riconoscere l'importanza della tematica e costituisce una base valida di informazioni per una concreta valutazione del problema sul piano immunotossicologico, epidemiologico, sociale ed economico. Può fornire, inoltre, spunti per ulteriori approfondimenti e può consentire di mettere a punto e validare specifici e mirati protocolli di indagine. Ancor più significa vigilare sui nuovi inquinanti xenobiotici che continuamente vengono introdotti nell'ambiente, sulle loro capacità di agenti potenzialmente patogeni in grado di sviluppare effetti nocivi con segnali di *defaillances* morfofunzionali delle cellule immunocompetenti, quali espressione preddittiva di un evento patogeno con possibili ripercussioni sulle produzioni zoeconomiche e sulla salubrità delle derrate alimentari.

BIBLIOGRAFIA

1. Ansar Ahmed S. (2000) The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. *Toxicology*, 150: 191-206.
2. Betta A., Maranelli G., Dal Ri C. (1989) Immunotossicità da pesticidi. *Med Lav*, 80: 381-389.
3. Blair A., Zahm S.H. (1990) Herbicides and cancer: a review and discussion of methodologic issues. *Cancer Res*, 120: 132-145.
4. Bondy G. and Pesta J.G. (2000) Immunomodulation by fungal toxins. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 3 (2): 109-143.
5. Borm P. J.A., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T., Fissan H., Donaldson K., Schins R., Stone V., Kreyling W., Lademann J., Krutmann J., Warheit D., Oberdorster E. (2006) The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology*, 3, 11.
6. Burns L.A., Meade B.J., Munson A.E. (1996) Toxic responses of the immune system In Casarett and Doull's *Toxicology*, C.D. Klaassen ed., 335-402, McGraw-Hill, New York.
7. Cabassi E., Miduri F., Lombardi G., Losio M.N., Fusari A., Corradi A. (2003) Aftosicosi indotta e risposta immunitaria in scrofe gravide: effetti della supplementazione con vitamina A e vitamina E. *Atti S.I.P.A.S.*, XXIX: 382-392.
8. Cabassi E., Di Lecce R., De Angelis E., Fusari A., Perillo A., Borghetti

- P.(2004) Aflatoxicosis and vitamins A and E supplementation in sows: immunological state of piglets. *Vet Res Comm*, 28: 275-277.
9. Cabassi E., Miduri F., Valente L., Pinotti L. (2005) Effetti di diete contaminate da ocratossina A e supplementate con vitamine A ed E in scrofe gravide e nella loro prole. *Ann Fac Med Vet di Parma*, XXV: 73-93.
10. Cabassi e., Miduri F., Cantoni A.M., Fusari A., Corradi A. (2005) Intossicazione da ocratossina A in scrofe gravide. *Atti S.I.S.Vet*, LIX: 121-122.
11. CAST (2003) Mycotoxins: risks in plant animal and human systems - Vol. Task Force Report 138, Council for Agricultural Science and Technology Ed., 66-72, Amy, IA, USA.
12. Colosio C., Barcellini W., Maroni M., Alcini D., Bersani M., Cavallo D., Galli A., Meroni P., Pastorelli R., Rizzardi G.P., Soleo L., Foà V. (1996) Immunomodulatory effects of occupational exposure to Mancozeb. *Arch Environ Health*, 51: 445-451.
13. Colosio C., Birindelli S., Corsini E., Galli C.L. and Maroni M. (2005) Low level exposure to chemicals and immune system. *Toxicol Appl Pharmacol*, 207 (Suppl 2): 320-328.
14. Corcoran B.M., Foster D.J., Fuentes V.L.(1995) Feline asthma syndrome: a retrospective study of the clinical presentation in 29 cats. *J Small Anim Practice*, 36: 481-488.
15. Corrier D.E. (1991) Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. *Vet Immunol Immunopath*, 30: 73-87.
16. Descotes J. (1986) Biphenyls In: *Immunotoxicology of drugs and chemicals*, Elsevier Ed., 342-345, Amsterdam- New York- Oxford.
17. Descotes J., Choquet-Kastylevsky G., Van Ganse E., Vial T. (2000) Responses of the immune system to injury. *Toxicol Pathol*, 28(3): 479-481.
18. Dewailly E., Ayotte P., Bruneau S., Gingras S., Belles-Isles M., Roy R. (2000) Susceptibility to infections and immune status in Inuit enfants exposed to organochlorines. *Environ Health Perspect*, 108: 205-211.
19. Di Rosa M., Fioretti M.C., Marcolongo F.R., Rugarli C. (2002) Immunofarmacologia e farmaci della risposta infiammatoria, 103-122, UTET, Torino.
20. Feron V.J., Arts J.H., Kuper C.F., Slootweg P.J., Woutersen R.A. (2001) Risks associated with inhaled nasal toxicants. *Crit Rev Toxicol*, 31: 313-347.
21. Franchini I. (1989) Immunotossicologia In *Seminari di Medicina del Lavoro e Tossicologia Industriale*, Pragma Ed., 101-123, Milano.
22. Galloway T. and Handy R. (2003) Immunotoxicity of organosphosphorous pesticides. *Ecotoxicology*, 12: 345-363.
23. Gleichmann E., Kimber I. and Purchase F.H.(1989) *Immunotoxicology: suppressive and stimulatory effects of drugs and environmental chemicals on the immune system. A discussion*. *Arch Toxicol*, 63: 257-273.
24. Kerkvliet N.I. (1995) Immunological effects of chlorinated dibenzo-p-dioxins. *Environ Health Perspect*, 103: 47-53.
25. Lawrence D.A., McCabe M.J. (2002) Immunomodulation by metals. *Int Immunopharmacol*, 2: 293-302.
26. Luppi A., De Angelis E., Losio N., Lombardi G., Miduri F., Cabassi E. (2002)

- Immunotossicità da aflatossine in scrofe gravide. Atti S.I.P.A.S., XXVIII: 127-136.
27. Luster M.I., Boormann G.A., Dean J.H., Luebke R.W., Lawson L.D. (1980) The effect of exposure to DES in the mouse: alterations on the immunological function. *J Reticuloendothel Soc*, 28: 561-569.
 28. Luster M.I., Ackermann M.F., Germolec D.R. and Rosenthal G.L. (1989) Perturbations of the immune system by xenobiotics. *Environ Health Perspect*, 81: 157-162.
 29. Miduri F., Dorigoni V., Marin A., Pozza G., Ferrel L., Di Lecce R., Cabassi E. (2005) Parametri immunofenotipici ed ematochimici quali indicatori di illecito trattamento con desametasone nel vitello a carne bianca. Atti S.I.S.Vet., LIX: 125-126.
 30. Mocchegiani E., Santarelli L., Tibaldi A., Corradi A., De Angelis E., Borghetti P., Bonomi A., Fabris N., Cabassi E. (1998) Zinc, thymic endocrine activity and mitogen responsiveness (PHA) in piglets exposed to maternal aflatoxicosis B1 and G1. *Vet Immunol Immunopathol*, 62: 245-260.
 31. Oswald I.P. and Comero C. (1998) Immunotoxicity of micotoxins. *Revue Méd Vét*, 149: 585-590.
 32. Pabst R., Rothkotter H.J. (2006) Structure and function of the gut mucosal immune system. *Adv Exp Med Biol*, 579, 1-14.
 33. Pier A.C. (1992) Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *J Anim Sci*, 70: 3694-3697.
 34. Piva A., Casadei G., Pagliuca, G., Cabassi E., Galvano F., Solfrizzo M., Riley R.T. and Diaz D.E. (2005) Activated carbon does not prevent the toxicity of culture material containing fumonisin B1 when fed to weanling piglets. *J Anim Sci*, 83: 1939-1947.
 35. Prochazková J. (1992) Analysis of the immunotoxic effects of xenobiotics. *Human Exp Toxicol*, 11: 65-70.
 36. Pruett S.B., Barnes D.B., Hany C., Munson A.E. (1992) Immunotoxicological characteristic of sodium methyldithiocarbamate. *Fundam Appl Toxicol*, 18: 40-47.
 37. Rooney A.A., Matulky R.A., Luebke R.W. (2003) Developmental atrazine exposure suppresses immune function in male but not female sprague-dawley rats. *Toxic Sci*, 76: 366-375.
 38. Silvotti L., Di Lecce R., Bonomi A., Borghetti P., Perillo A., Piedimonte G., Corradi A., Cabassi E. (1995) In vitro responses of macrophages and lymphocytes of pigs fed with aflatoxins B1 and G1. *European J Vet Pathol*, 1: 117-121.
 39. Silvotti L., Petterino C., Bonomi A., Cabassi E. (1997) Immunotoxicological effects on piglets of feeding sows diets containing aflatoxins. *Vet Rec*, 141: 469-472.
 40. Tryphonas H (1994) Immunotoxicity of polychlorinated biphenyls: present status and future considerations. *Exp Clin Immunogenet*, 11: 149-162.
 41. Vos J.D., Deheer C., Van Louren H. (1997/98) Immunotoxic effects of TCDD and toxic equivalency factors. *Teratog Carcinog Mutagen*, 17: 275-284.

REATI ALIMENTARI E PROBLEMATICHE IGIENICO-SANITARIE IN ITALIA NEL QUINQUENNIO 1995-1999: RISULTATI DI UN'INDAGINE STATISTICA

FOOD CRIMES REPRESSION AND FOODBORNE DISEASES IN ITALY BETWEEN 1995 AND 1999: A STATISTICAL REPORT

Salsi Alessandra*, Ricciardi Gianluca, Paris Arianna, Riboldi Elisa, Brindani Franco

PAROLE CHIAVE:

sicurezza alimentare, frodi, tossinfezioni alimentari, vigilanza.

KEY WORDS:

food safety, frauds, foodborne diseases, control.

Riassunto

Con il presente lavoro si è cercato di analizzare statisticamente i dati inerenti i principali reati in campo alimentare, in Italia, dal 1995 al 1999, concentrandosi su quelli che hanno per oggetto alimenti di origine animale. Ciò ha permesso di osservare la distribuzione delle sentenze penali nelle singole regioni, monitorando le tipologie di reati verificatisi e gli alimenti maggiormente coinvolti. Tali dati sono stati messi a confronto con quelli relativi all'incidenza delle malattie di origine alimentare negli stessi anni. Si è pertanto evidenziata la necessità di intensificare i controlli, di potenziare il sistema di raccolta dei dati, trasmettendoli in maniera più completa e tempestiva, nonché l'opportunità di rendere le pene maggiormente dissuasive, al fine di una più efficace tutela del consumatore.

Summary

The research points to analyze the data concerning the main crimes in the food field, in Italy, between 1995 and 1999, focusing on those involving food of animal origin. The distribution of the penitentiary sentences in each Italian Region was shown and the types of crimes connected with the most involved foodstuffs were displayed. These data were compared with those concerning the incidence of foodborne diseases in the same period, showing the need for an upgrade in the inspection system and a faster transmission of the data. Moreover, punishments should be more relevant

Dipartimento di Salute Animale - Sezione di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale
Recapiti 1° autore: Tel. 0521.902741
e-mail: alessandra.salsi@nemo.unipr.it

and effective, to improve the sanitary guarantees for the consumers.

Premessa

La legislazione relativa all'ambito alimentare ha come obiettivo la salvaguardia sia della salute del consumatore, sia della lealtà delle operazioni commerciali. Già da alcuni anni, in ambito europeo, si sta assistendo ad un profondo rinnovamento dei dispositivi di legge, tesi a costituire, da un lato, un efficace sistema di prevenzione dei rischi alimentari da parte del produttore, grazie all'applicazione dell'HACCP; dall'altro, un più coordinato sistema di controlli ufficiali.

Il cammino di riforma della legislazione alimentare ha trovato uno sbocco significativo nell'emanazione del Pacchetto Igiene e dei Regolamenti annessi; parallelamente, mediante la Direttiva 41/04, si è disposta l'abrogazione delle vecchie Direttive verticali, sulle quali si reggeva la precedente normativa. Ciononostante, in Italia l'intero apparato sanzionatorio si basa, tuttora, sulla Legge 20 Aprile 1962, n. 283 "Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande" e su alcuni articoli del Codice Penale (10).

Con il presente lavoro si è cercato di analizzare statisticamente i dati inerenti i principali reati in campo alimentare, in Italia, dal 1995 al 1999, concentrandosi su quelli che hanno per oggetto alimenti di origine animale. Ciò ha permesso di osservare la distribuzione delle sentenze penali nelle singole regioni, monitorando le tipologie di reati verificatisi e gli alimenti maggiormente coinvolti. La scelta di svolgere l'indagine negli anni a cavallo del 1997, che segna l'entrata in vigore del D.Lgs 155 sull'autocontrollo (2), inoltre, rappresenta un tentativo di valutare se l'applicazione della metodologia HACCP abbia apportato un miglioramento, relativamente al numero e al tipo di infrazioni penali riscontrate.

In una seconda fase della ricerca, infine, sono stati reperiti i dati relativi all'incidenza delle malattie di origine alimentare negli stessi anni, che sono stati confrontati, nel limite del possibile, con quelli relativi alle frodi alimentari, nell'ottica di completare la panoramica sui problemi sanitari connessi al consumo di alimenti di origine animale nel nostro Paese.

Le fonti informative

In Italia, la Legge 7 agosto 1986, n. 462, convertendo il Decreto Legge 18 giugno 1986, n. 282, ha disposto misure urgenti in materia di prevenzione e repressione delle sofisticazioni alimentari. Tali disposizioni, emanate in seguito al primo, clamoroso scandalo alimentare italiano (il cosiddetto "vino al metanolo"), hanno posto in luce la necessità di potenziare i servizi di controllo, aumentando gli organici dei NAS, gli uffici periferici delle dogane ed istituendo l'Ispettorato Centrale Repressione Frodi, articolato in uffici interregionali, regionali ed interprovinciali (11). L'art. 8 della L. 462/86, poi, ha previsto l'istituzione di un centro di raccolta informatizzata dei risultati delle analisi condotte dalle Autorità preposte al controllo, per conoscere l'andamento del fenomeno delle frodi e delle sofisticazioni; il comma 4 dello stesso articolo, infine, ha disposto l'istituzione di un elenco pubblico delle ditte commerciali

e dei produttori condannati per reati di frode e di sofisticazione alimentare, a cura dell'allora Ministero della Sanità.

Tale documento viene pubblicato, tramite Ordinanza Ministeriale, con frequenza indicativamente annuale e riporta, purtroppo, le sentenze antecedenti 5 anni dalla data di pubblicazione. Per tale ragione, il materiale di cui si può disporre è piuttosto datato e non è possibile, al momento (Dicembre 2006), disporre di informazioni più recenti (12,13,14,15,16,17).

Più efficiente appare la pubblicazione del Report annuale "Vigilanza e controllo degli alimenti e delle bevande in Italia", realizzato dalla Direzione Generale Sanità Veterinaria e Alimenti del Ministero della Salute, grazie alla quale sono disponibili i dati fino al 2003, relativi ai risultati dei controlli delle autorità competenti, che comprendono anche le ispezioni non sanzionate e quelle punite solo dal punto di vista amministrativo (8).

Relativamente, poi, ai dati riguardanti le malattie di origine alimentare, il Ministero della Salute diffonde un bollettino annuale dei dati epidemiologici sulle malattie infettive. Sul sito del Ministero è possibile reperire, attualmente, i dati dal 1993 al 2004 (definitivi), oltre ai dati provvisori per l'anno 2005 (9).

I reati alimentari relativi ai prodotti di origine animale dal 1995 al 1999

Prima di entrare nel dettaglio, è necessario specificare che, a fianco di sentenze che riportano accuratamente la tipologia di alimenti coinvolti e le norme violate, ve ne sono numerose che non forniscono tali dati. Risulta, in tal modo, impossibile distinguere con certezza le sentenze riguardanti alimenti di origine animale. Si è, pertanto, deciso di valutare caso per caso e di conteggiare (come "alimenti vari") anche sentenze per le quali non fosse possibile escludere un coinvolgimento di alimenti di origine animale (ad esempio, un generico ristorante con problematiche di igiene generale o di cattiva conservazione della merce nel suo complesso).

Analizzando, innanzitutto, il numero complessivo di sentenze annue, si rileva che il 1998 è l'anno in cui se ne riscontra il maggior numero (640), seguito dal 1999, 1997, 1996 e 1995, con, rispettivamente, 506, 490, 471 e 433 sentenze annue. Relativamente alla distribuzione geografica delle stesse, rapportandone il numero, per ciascuna regione, a 100.000 abitanti (**Fig. n. 1**), si osserva che le regioni maggiormente coinvolte sono il Friuli Venezia-Giulia, con 3,4 sentenze/100.000 abitanti (valore medio nei 5 anni), il Piemonte (3,13) e la Sardegna (2,95), seguite da Liguria, Toscana, Marche, Emilia-Romagna ed Umbria, a fronte di una media nazionale di 0,99 sentenze annue/100.000 abitanti. Vi sono, peraltro, regioni che non compaiono in elenco, quali, ad esempio, Calabria e Valle d'Aosta, nelle quali non si registra alcuna sentenza nei 5 anni. Tale dato si potrebbe prestare a diverse interpretazioni: un'improbabile estrema diligenza dei produttori delle summenzionate regioni, un'inadeguatezza nei controlli o un mancato funzionamento del sistema informativo.

Dopo avere presentato il quadro relativo al numero di sentenze, il primo dato da considerare è quello relativo alle tipologie di violazione riscontrate, intendendo, con tale termine, le infrazioni a singole leggi, o singoli articoli del Codice Penale. Nella **Figura n. 2** è riportata la distribuzione delle infrazioni in base alla norma vio-

lata: il loro numero è significativamente superiore al numero delle sentenze, poichè ogni sentenza può contemplare più di una violazione. La principale norma violata, come già ricordato, è la **Legge 283/62** e, più in particolare, gli **artt. 2** (mancanza di autorizzazione sanitaria), **5** (vendita/detenzione/somministrazione di alimenti in cattivo stato di conservazione, insudiciate, adulterate, private di elementi nutritivi, contenenti additivi chimici non consentiti o altri residui) e **6** (produzione/detenzione/commercio di additivi chimici e surrogati di prodotti alimentari), seguita dall'articolo **515 del Codice Penale** (Frode nell'esercizio del commercio, ovvero consegna di un bene diverso da quanto pattuito). Vengono poi menzionati gli **artt. 444** (Commercio di sostanze alimentari nocive), **516** (Vendita di sostanze alimentari non genuine come genuine), oltre ad alcune norme specifiche per determinati alimenti, raggruppati nella voce "altri".

Si può osservare come la norma maggiormente violata risulti costantemente l'articolo 5: la notifica di tale violazione aumenta dal 1995 al 1998, per poi diminuire nel 1999. Questo dato è facilmente giustificabile, considerando che la norma comprende numerose fattispecie perseguibili penalmente, che spaziano da una generica inadeguatezza dell'igiene dei locali e delle attrezzature di lavorazione, alla presenza di microrganismi patogeni o di additivi chimici non consentiti, fino alla vendita di alimenti scaduti.

Per quanto riguarda gli alimenti coinvolti (**Fig. n. 3**), le matrici carnee risultano nettamente al primo posto nell'intero periodo considerato, seguite da latte e derivati, prodotti ittici, paste ripiene, prodotti di pasticceria e alimenti vari (comprendenti ovoprodotti e alimenti composti non ascrivibili alle sopracitate categorie).

Relativamente alle principali problematiche commerciali e igienico-sanitarie riscontrate (**Fig. n. 4**), il reato più frequente è la vendita di sostanze contaminate da microrganismi, intendendo, con tale termine, la presenza di batteri alterativi o patogeni (frequente il riscontro di *Salmonella* spp., coliformi e stafilococchi coagulasi positivi), muffe, parassiti (larve di *Anisakis* nei prodotti ittici) e altri infestanti. L'andamento della violazione appare, anche in questo caso, crescente fino al 1998, con una diminuzione significativa nell'anno successivo.

Al secondo posto, in termini di frequenza, si trova la vendita di sostanze alimentari definite "in cattivo stato di conservazione", il che comprende casi di abuso termico o la mancata protezione degli alimenti da contaminazioni esterne (non è raro, comunque, che nell'ordinanza non venga riportata la violazione nel dettaglio).

La presenza di residui o additivi chimici non consentiti è pure piuttosto frequente, con un picco massimo, anche in questo caso, nel 1998. Tra gli additivi più spesso riscontrati, oltre i dosaggi consentiti, vi sono i solfiti ed i nitrati, impiegati massicciamente nei prodotti carnei a scopo stabilizzante.

In quarta posizione sono riportate le problematiche relative alla somministrazione di prodotti alimentari congelati, senza farne menzione al cliente, mentre al quinto posto si trova la vendita di alimenti scaduti, o la ben più grave contraffazione volontaria della data di scadenza. Infine, vengono riportate le sanzioni relative a mancanza di igiene negli ambienti di lavorazione.

Benefici di legge

Numerosi sono i casi che si concludono con una condanna attenuata dall'applicazione di benefici di legge, intendendo, con tale termine, la sospensione condizionale della pena o la non menzione della condanna nel certificato del casellario giudiziale (1, 18). Nel primo caso, la pena inflitta rimane sospesa per un certo periodo, decorso il quale, se il condannato non ha commesso un delitto o una contravvenzione analoga ed ha adempiuto agli obblighi impostigli, il reato è estinto. Il beneficio è applicabile nel caso in cui la condanna non superi un certo livello di gravità (due anni di pena detentiva o una pena pecuniaria che, sola o congiuntamente a questa, risulti nel complesso superiore a due anni), ma tale livello è difficilmente superato nel caso dei reati alimentari, per i quali normalmente si ricorre al patteggiamento. La sospensione condizionale della pena, inoltre, non può essere concessa più di due volte. Tale beneficio, considerando il totale delle sentenze emesse, è stato applicato 57 volte nel 1995 (10% del totale delle sentenze relative a tale anno), 40 volte nel 1996 (7%), 24 nel 1997 (4%), 44 nel 1998 (5%) e 42 nel 1999 (7%).

Relativamente al beneficio della non menzione della condanna, che permette di mantenere integra la fedina penale del condannato (nel caso in cui non siano superati i due anni di detenzione o 516,00 euro di sanzione pecuniaria), questo è stato applicato 135 volte nel 1995 (24% del totale delle sentenze relative a tale anno), 105 nel 1996 (19%), 195 nel 1997 (34%), 268 nel 1998 (31%) e 212 nel 1999 (36%) (Fig. n. 5).

Malattie a trasmissione alimentare dal 1995 al 1999

Nel nostro Paese, le malattie a trasmissione alimentare vengono segnalate mediante il sistema di notifica obbligatoria delle malattie infettive, coordinato, a livello nazionale, dal Ministero della Salute e regolamentato con Decreto Ministeriale 15.12.1990 (3). Tale provvedimento prescrive l'obbligo, per i medici di base, di notificare tutti i casi delle malattie infettive e diffusive riportate nel decreto stesso, di cui siano venuti a conoscenza nell'esercizio della loro professione.

Le patologie notificabili sono suddivise in 5 classi secondo la gravità e la possibilità di un intervento o la necessità di raccogliere informazioni particolari. Le classi di interesse, per quanto riguarda le malattie a trasmissione alimentare, sono la 1, che raccoglie notifiche di patologie poco frequenti ma gravi, per le quali è richiesta un'immediata segnalazione (botulismo, colera, trichinosi) e la classe 2, che prevede la rilevazione di malattie ad elevata frequenza e/o passibili di interventi di controllo sul lungo periodo (brucellosi, diarrea infettiva, epatite A, febbre tifoide, listeriosi, leptospirosi, salmonellosi non tifoidea, tularemia). Inoltre, patologie a trasmissione alimentare possono essere segnalate anche nella classe 4 (notifica di focolai epidemici) e nella 5 (zoonosi e malattie infettive non incluse nelle classi precedenti).

La norma prevede, relativamente agli agenti infettivi di interesse alimentare, la raccolta di dati riguardanti episodi di botulismo, trichinosi, brucellosi, diarreie infettive non causate da *Salmonella* spp., epatite virale, febbre tifoide, listeriosi e salmonellosi non tifoidee. Si tratta, pertanto, di una raccolta di informazioni solo

parziale. A livello europeo, la Direttiva 117/92/CEE e la successiva Direttiva 99/2003 prevedono, invece, la raccolta di informazioni in merito a zoonosi e tossinfezioni alimentari, monitorando anche il fenomeno dell'antibiotico-resistenza (4, 5). I dati così reperiti sono pubblicati, anch'essi, in un report annuale, a cura dell'Autorità Europea sulla Sicurezza Alimentare (6). Tale documento illustra i dati epidemiologici relativi ai singoli Stati Membri in merito al verificarsi di casi epidemici o sporadici di *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* verocitotossici, *Mycobacterium bovis*, *Brucella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Trichinella*, *Echinococcus*, *Toxoplasma*, *Rabdo virus* ed altri agenti eziologici, oltre a contenere un capitolo dedicato agli episodi di tossinfezione alimentare, che prende in considerazione anche virus, tossine (marine o di diversa origine) ed altri agenti, chimici e microbiologici. Purtroppo, l'invio di tali informazioni avviene su base volontaria e nel primo report, realizzato nel 2004 e pubblicato nel Febbraio 2006, non compaiono i dati italiani che, nell'ambito della presente indagine epidemiologica, sarebbero risultati, a nostro parere, altamente significativi.

Dal confronto tra i dati ministeriali sull'incidenza delle tossinfezioni alimentari e quelli riguardanti il numero di sentenze penali passate in giudicato fra il 1995 e il 1999 (**Fig. n. 5**), emerge una significativa differenza. A fronte di 138.182 casi di tossinfezione alimentare, si registrano, infatti, 3.159 sentenze penali, pari al 2,29%. Non è però possibile confrontare i due dati senza premettere alcune considerazioni.

In primo luogo, solo una piccola parte dei casi di tossinfezione alimentare viene portata a conoscenza del medico. I casi meno gravi, caratterizzati da sintomatologie autolimitanti a pochi giorni, non vengono notificati che saltuariamente, soprattutto se il soggetto colpito è un adulto immunocompetente. Già da alcuni anni, pertanto, ci si avvale di fattori di correzione, tanto più alti quanto più la patologia conseguente alla tossinfezione è di lieve entità e che, moltiplicati per il numero di casi notificati, dovrebbero fornire un quadro più rappresentativo sulla reale incidenza dei fenomeni. Tali coefficienti, proposti da Mead nel 1999, sono: 38x per i casi più lievi, 20x per le patologie intermedie e 2x per i casi gravi.

Ipotizzando di applicare i coefficienti correttivi di cui sopra, il numero di casi tossinfettivi da considerare sarebbe di **3.289.312** (considerando Listeriosi, Febbre Tifoide e Botulismo tra le patologie gravi, Salmonellosi, Trichinosi ed Epatite A tra le patologie di gravità intermedia e diarree infettive ed i casi sostenuti da agenti non specificati, arbitrariamente, di lieve entità).

Nel riportare tale dato al numero di sentenze penali passate in giudicato è però necessario ricordare altri fattori, che possono, invece, ridimensionare il divario osservato. È noto, infatti, che il fenomeno delle tossinfezioni non può essere imputato unicamente al produttore o al distributore degli alimenti coinvolti: una corretta preparazione a livello domestico è infatti ugualmente fondamentale. L'incidenza di inadeguate pratiche di manipolazione degli alimenti in ambito domestico viene stimata in maniera piuttosto variabile da diversi autori, in base ai dati epidemiologici consultati, i quali sono spesso incompleti. Alcuni autori riportano percentuali variabili dal 40 al 70% di tossinfezioni alimentari originate in casa, dove le cause più frequenti sarebbero riconducibili a: preparazione eccessivamente anticipata, conservazione a tempera-

tura ambiente, raffreddamento o riscaldamento inadeguati, scorretto scongelamento, contaminazione crociata.

In un'interessante indagine, condotta nell'ambito del "Progetto PASSI" (Progressi delle aziende sanitarie per la salute in Italia (7) nel 2005, alcuni operatori dei servizi di Sanità Pubblica hanno cercato di fare luce sui principali comportamenti scorretti e sulla loro frequenza nella popolazione. In tale contesto, si è stimato che le malattie a trasmissione alimentare siano originate in ambito domestico, addirittura nell'80% dei casi. L'indagine ha rilevato, in particolare, che il 65% della popolazione (soprattutto in fasce con un elevato livello di istruzione) è solita consumare alimenti crudi o poco cotti, fra cui salsiccia e frutti di mare, notoriamente caratterizzati da un elevato rischio microbiologico. Il 70% degli intervistati, inoltre, scongela gli alimenti in maniera scorretta e meno del 40% legge completamente l'etichetta dei prodotti alimentari acquistati, tralasciando le istruzioni per l'uso e la conservazione.

Il risultato dei soprariportati comportamenti è così riassumibile: la principale problematica sanitaria risulta essere, nell'arco del quinquennio considerato, *Salmonella* spp., con oltre 74.000 casi, seguita da Epatite A (circa 25.000 episodi), diarrea infettiva, febbre tifoide, botulismo e listeriosi (**Fig. n. 6**).

Le regioni maggiormente interessate da tossinfezioni (**Fig. n. 7**) risultano essere Umbria, Molise, Marche e Trentino Alto-Adige, con oltre 60 episodi/100.000 abitanti. Calabria e Sicilia, invece, ne registrano il minor numero (meno di 20 episodi/100.000 abitanti) ma, anche in questo caso, si potrebbe dubitare dell'efficacia della trasmissione dei dati.

Conclusioni

I dati relativi alle sentenze penali testimoniano, in primo luogo, una notevole disomogeneità nell'applicazione dei controlli e della trasmissione delle informazioni all'Autorità centrale. Tale carenza si verifica da decenni, e non sembra destinata a risolversi a breve (in base a quanto riportato dall'Ufficio Ministeriale competente, che sta mettendo a punto la relazione riguardante gli anni 2000-2001-2002), in quanto regioni come Calabria e Valle d'Aosta, oltre a città come Roma, continuano a non trasmettere i dati.

L'elevato numero di casi di tossinfezione alimentare, benché non imputabile unicamente a carenze da parte del produttore e del distributore, trova riscontro nella netta prevalenza di sentenze relative a problematiche microbiologiche o a cattive modalità di conservazione del prodotto. Relativamente, poi, alla valutazione di eventuali miglioramenti apportati dal D.Lgs. 155/97, che responsabilizza il produttore con l'attuazione dell'autocontrollo, l'analisi del contenuto delle sentenze non denota certo un incremento del livello di sicurezza alimentare nel Paese. Il numero di reati alimentari è, infatti, andato aumentando nel quinquennio considerato, con un picco nel 1998, anno successivo all'entrata in vigore del provvedimento. A questo proposito, si può considerare che gli operatori abbiano potuto avvalersi di un certo periodo di tempo per realizzare un manuale HACCP e porre in essere le misure preventive del caso. Si potrebbe, quindi, ottimisticamente augurarsi che un'efficacia preventiva del Decreto possa iniziare a manifestarsi a partire dal nuovo millennio.

L'efferatezza di alcune fattispecie punite e la malafede dimostrata da alcuni imputati, lasciano però credere che, in certi casi, l'autocontrollo non possa avere influito su situazioni in cui mancano le più comuni norme igieniche ed un normale buonsenso. L'elevata percentuale di sentenze che si concludono con un beneficio di legge, poi, suggerisce che, all'inadeguatezza dei controlli, si associ un'inefficienza delle sanzioni, che in molti casi non appaiono né commisurate alla gravità del fatto, né dissuasive.

L'indagine condotta mostra, quindi, che il cammino verso reali garanzie per il consumatore è ancora piuttosto lungo e che molti passi avanti dovranno essere fatti, sia da parte degli operatori del settore alimentare, sia delle autorità di controllo.

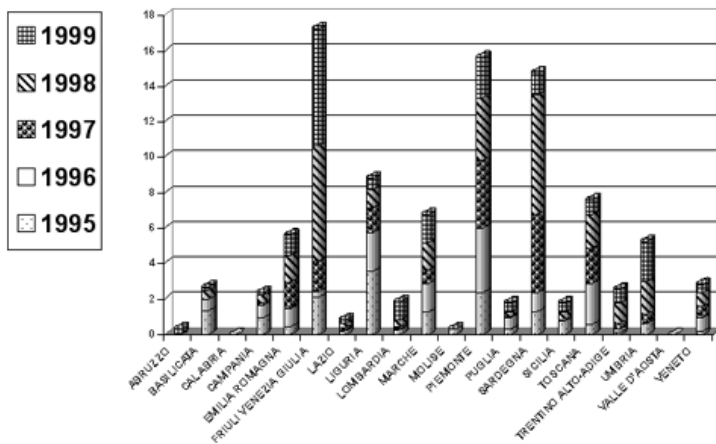


Figura n. 1: Numero di sentenze passate in giudicato relative a frodi e sofisticazioni di alimenti di origine animale nelle diverse Regioni d'Italia, riferite a 100.000 abitanti.

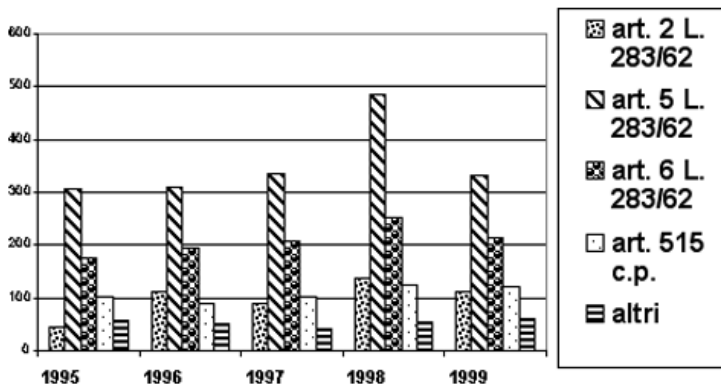


Figura n. 2: Distribuzione delle violazioni nel quinquennio, in base alla norma violata.

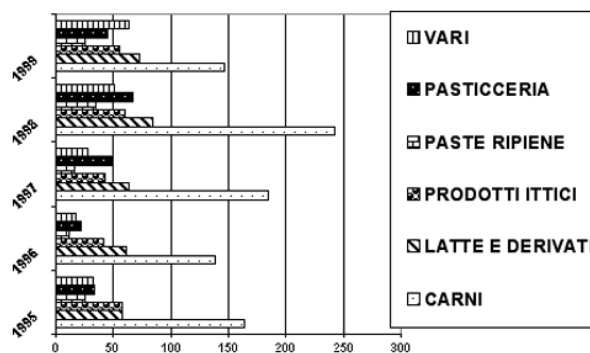


Figura n. 3: Distribuzione delle violazioni in base all'alimento coinvolto.

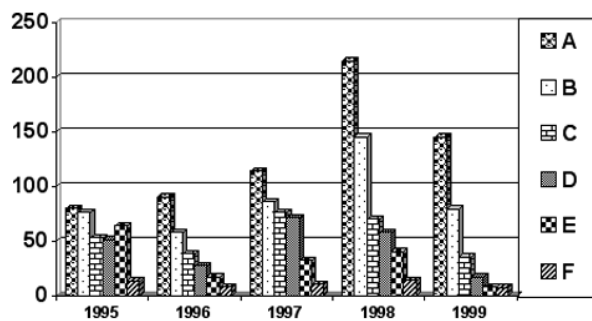


Figura n. 4: Principali problematiche commerciali e igienico-sanitarie riscontrate.

Legenda:

A: Problematiche microbiologiche; **B:** Alimenti in cattivo stato di conservazione; **C:** Presenza di additivi non ammessi o contaminanti chimici; **D:** Impiego di alimenti congelati non dichiarati; **E:** Alimenti scaduti o contraffazione data di scadenza; **F:** Inadeguata igiene ambientale.

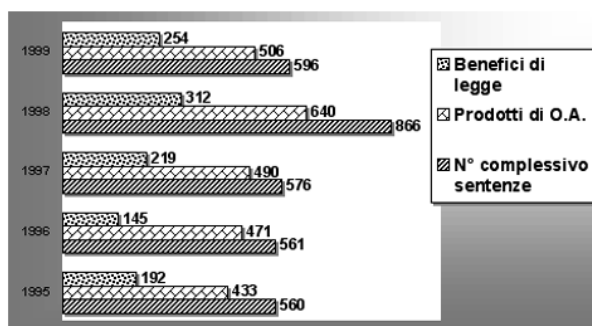


Fig. n. 5: Ripartizione delle sentenze: numero complessivo, numero di casi relativi ad alimenti di origine animale, numero di casi che hanno usufruito di benefici di legge.

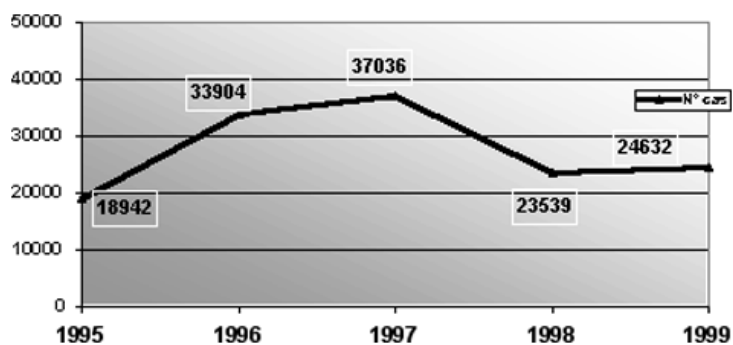


Fig. n. 6: Numero di tossinfezioni notificate al Ministero della Salute (1995-1999).

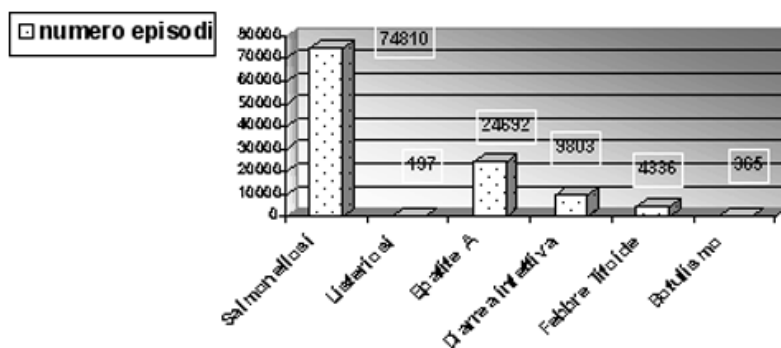


Figura n. 7: Distribuzione delle tossinfezioni notificate al Ministero della Salute (1995-1999).

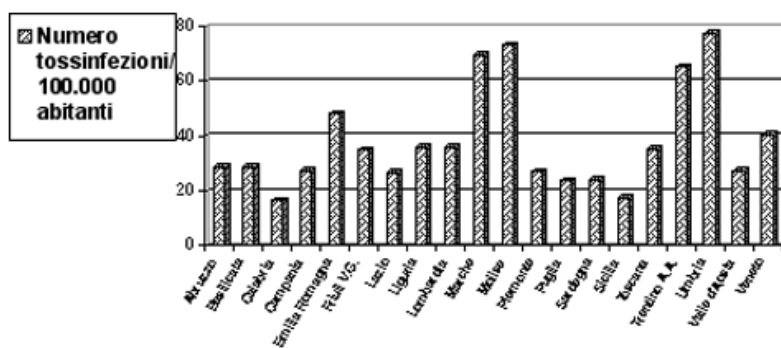


Figura n. 8: Numero di tossinfezioni riferite a 100.000 abitanti nelle singole regioni.

Ringraziamenti

Si ringraziano per la preziosa collaborazione il Dott. Stefano Catellani, Dottore di Ricerca in Disciplina Nazionale ed Europea sulla Produzione ed il Controllo degli Alimenti ed il Dott. Claudio Lancia del Ministero della Salute.

Bibliografia

1. Conso G., Grevi V. (2006). *Compendio di Procedura Penale*. Ed. Cedam, Padova.
2. Decreto Legislativo del Governo n. 155 del 26/05/1997. Attuazione delle Direttive 93/43/CEE e 96/3/CE concernenti l'igiene dei prodotti alimentari.
3. Decreto Ministeriale 15 dicembre 1990. Sistema informativo delle malattie infettive e diffusive.
4. Direttiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003 sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della Decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la Direttiva 92/117/CEE del Consiglio.
5. Direttiva 92/117/CEE del Consiglio del 17 dicembre 1992 riguardante le misure di protezione dalle zoonosi specifiche e la lotta contro agenti zoonotici specifici negli animali e nei prodotti di origine animale allo scopo di evitare focolai di infezioni e intossicazioni alimentari.
6. http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring_zoonoses/reports.html
7. <http://www.epicentro.iss.it/passi/workshop11.asp>
8. <http://www.ministerosalute.it/alimenti/sicurezza/sicApprofondimento.jsp?lang=italiano&label=con&id=340>
9. <http://www.ministerosalute.it/promozione/malattie/bollettino.jsp>
10. Legge 30 aprile 1962, n. 283 (in Gazz. Uff., 4 giugno, n. 139). -- Modifica degli articoli 242, 243, 247, 250 e 262 del testo unico delle leggi sanitarie, approvato con Regio Decreto 27 luglio 1934, n. 1265: Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande.
11. Legge 7 agosto 1986, n. 462: conversione in legge, con modificazioni, del Decreto Legge 18 giugno 1986, n. 282, recante misure urgenti in materia di prevenzione e repressione delle sofisticazioni alimentari.
12. Ordinanza Ministeriale 03/12/1998. Pubblicazione dell'elenco delle sentenze penali passate in giudicato nell'anno 1995 a carico di produttori e ditte alimentari condannati per reati di frode e sofisticazioni alimentari.
13. Ordinanza Ministeriale 20/06/2000. Pubblicazione dell'elenco delle sentenze penali passate in giudicato nell'anno 1996 a carico di produttori e ditte alimentari condannati per reati di frode e sofisticazioni alimentari.
14. Ordinanza Ministeriale 21/11/2000. Pubblicazione dell'elenco delle sentenze penali passate in giudicato nell'anno 1997 a carico di produttori e ditte alimentari condannati per reati di frode e sofisticazioni alimentari.
15. Ordinanza Ministeriale 25/06/1997. Pubblicazione dell'elenco delle sentenze penali passate in giudicato nell'anno 1994 a carico di produttori e ditte

- alimentari condannati per reati di frodi e sofisticazioni alimentari.
16. Ordinanza Ministeriale del 21/12/2000. Pubblicazione dell'elenco delle sentenze penali passate in giudicato nell'anno 1998 a carico di produttori e ditte alimentari condannati per reati di frode e sofisticazione alimentare.
 17. Ordinanza Ministeriale del 26/01/2004. Elenco delle sentenze penali passate in giudicato nell'anno 1999 a carico di produttori e ditte alimentari condannati per reati di frode e sofisticazioni alimentari.
 18. Padovani T. (1998). Diritto penale. Ed. Giuffr , Milano.

ANALISI DEI RISCHI DELL'ALLEVAMENTO ZOOTECNICO E SICUREZZA DEI PRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE: ASPETTI IGIENICO-SANITARI E NORMATIVI

Signorini G.¹, Biagi G.², Nannipieri S.³, Marzotto G.³, Pandolfi C.⁴

PAROLE CHIAVE:

sicurezza alimentare, igiene dei prodotti di origine animale, normativa.

KEY WORDS:

food safety, hygienic production of food of animal origin, rules.

Riassunto

Gli autori, per valutare l'analisi dei rischi dell'allevamento zootecnico e la sicurezza dei prodotti di origine animale, prendono in considerazione, in ambito comunitario, i regolamenti emanati dall'UE che costituiscono il così detto "pacchetto igiene" e, in ambito nazionale, i Decreti Legislativi n. 158 del 16 marzo 2006 e n. 193 del 6 aprile 2006 oltre ai piani nazionali per la ricerca residui per quanto attiene i farmaci veterinari (PNR) ed ai piani nazionali di vigilanza e controlli sanitari sulla alimentazione animale (PNAA).

Introduzione

Sono noti gli stretti rapporti tra benessere-salute animale e sicurezza dei prodotti di origine animale (o.a). Già nel 2000 il Libro Bianco sulla sicurezza alimentare della Commissione delle Comunità Europee stabiliva che "l'analisi del rischio deve costituire il fondamento su cui si basa la politica di sicurezza degli alimenti". Ne consegue che l'Unione Europea (UE) deve prendere le mosse, nella politica alimentare, dall'applicazione delle tre componenti dell'analisi del rischio: valutazione del rischio (consulenza scientifica e analisi dell'informazione), gestione del rischio (norme e controlli) e comunicazione del rischio.

Questi presupposti hanno dato l'avvio all'istituto della Vigilanza Veterinaria Permanente (VVP) che stabilisce i compiti istituzionali del Veterinario Ufficiale che possono essere essenzialmente riassunti in:

- esecuzione dell'ispezione ante e post mortem nei macelli,
- verifica della qualità igienica delle materie prime, dei semilavorati e dei prodotti finiti,

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

² Dipartimento di Clinica Veterinaria - Università Studi Pisa

³ Veterinario Dirigente - ASL 6 Zona Livorno

⁴ Libero professionista - Ancona

- controllo della pulizia e della manutenzione dei locali, degli impianti, delle attrezzature e degli utensili,
- controllo dell'igiene delle lavorazioni e della manipolazione delle sostanze alimentari,
- controllo dell'igiene del personale,
- controllo della bollatura sanitaria dei prodotti,
- verifica del sistema di autocontrollo,
- esecuzione di tutti gli esami complementari ritenuti necessari per verificare il rispetto della normativa.

Al Veterinario Ufficiale spetta inoltre il compito di verificare che lo stabilimento mantenga i requisiti strutturali, funzionali ed igienico-sanitari in base ai quali è stato rilasciato il decreto di riconoscimento e di adottare tutti i provvedimenti necessari al fine di garantire il rispetto della normativa.

La programmazione della VVP può considerarsi strutturata in sette fasi ognuna delle quale presuppone una conseguente determinata azione e precisamente:

- | | |
|---------------------------------------|--------------------|
| 1) Elenco attività di controllo | Cosa Fare |
| 2) Procedure di controllo | Come Fare |
| 3) Valutazione del livello di rischio | Perché Fare |
| 4) Programmazione dell'attività | Quando Fare |
| 5) Documentazione dell'attività | Cosa è Stato Fatto |
| 6) Verifica dell'attività | Come è Stato Fatto |
| 7) Riprogrammazione dell'attività | |

Il dettato del Libro Bianco ha costituito successivamente la base del Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 “che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare” (GUCE L 31, 01.02.2002). Il termine Sicurezza Alimentare sottintende l'attuazione degli accorgimenti tecnico-legislativi finalizzati a garantire la salute e il benessere del consumatore. La politica alimentare fonda le sue peculiarità su livelli elevati di sicurezza. In tale contesto il campo di applicazione coinvolge tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione degli alimenti e anche dei mangimi prodotti per gli animali destinati alla produzione alimentare o ad essi somministrati. L'accezione “Sicurezza Alimentare” comprende tanto Principi, cioè il principio di precauzione e l'analisi scientifica delle problematiche che Strumenti, cioè l'Autorità comunitaria sulla sicurezza alimentare e gli organismi omologhi sorti o sorgenti nei diversi Stati membri. In tale ottica sono da menzionare i Sistemi di gestione/prevenzione dei rischi di cui fanno parte: tracciabilità/etichettatura, igiene delle produzioni alimentari (autocontrollo-Haccp), controlli ufficiali, disciplina dei contaminanti e degli imballaggi, disciplina degli additivi alimentari, disciplina dei mangimi per animali, sistema comunitario di allarme rapido (rete, della cui gestione è responsabile la Commissione, per la notificazione di un rischio diretto o indiretto per la salute umana dovuto ad alimenti o mangimi), disciplina delle nuove frontiere della legislazione alimentare con particolare riferimento a OGM e Prodotti Biologici.

Gli obiettivi fissati dal Regolamento (CE) n. 178/2002 possono essere così sintetizzati: protezione della salute umana, protezione degli interessi dei consumatori, tutela dell'ambiente, eliminazione degli ostacoli al commercio, valutazione dell'importanza della salute degli animali e della rilevanza dei mangimi come elementi essenziali della catena alimentare.

Per realizzare tali obiettivi, il legislatore pone a carico degli operatori specifiche responsabilità concernenti: la sicurezza degli alimenti per il consumo umano e quella dei mangimi per gli animali; l'etichettatura, la pubblicità, il confezionamento, ecc. degli alimenti e dei mangimi; la rintracciabilità relativamente agli alimenti, ai mangimi e agli animali della catena alimentare; il ritiro degli alimenti e dei mangimi dal mercato e il coinvolgimento dei consumatori e delle autorità responsabili. Per quanto concerne le competenze, il regolamento assegna alle autorità: il compito delle analisi del rischio da eseguire nel rispetto del principio di precauzione; la verifica delle pratiche fraudolente e della adulterazione degli alimenti; la consultazione e l'informazione dei cittadini, la consulenza, l'assistenza scientifica e la tecnica; gli interventi precauzionali quali: allarme rapido, emergenza e gestione della crisi.

Le produzioni zootecniche alla luce della vigente normativa

Le nuove frontiere della sicurezza alimentare impongono talune riflessioni sulla dinamica di un settore di peculiare importanza in cui tutti siamo coinvolti. Il richiamo ci viene dall'UE che ha scelto di perseguire un livello elevato di tutela della salute nella elaborazione della legislazione alimentare da applicare in maniera non discriminatoria e quindi a prescindere dal fatto che gli alimenti o i mangimi siano in commercio sul mercato interno o su quello internazionale. L'esperienza ha dimostrato che per garantire la sicurezza degli alimenti occorre considerare tutti gli aspetti della catena della produzione alimentare come un unico processo, a partire dalla produzione primaria inclusa, passando per la produzione di mangimi fino alla vendita o erogazione di alimenti al consumatore inclusa, in quanto ciascun elemento di essa presenta un potenziale impatto sulla sicurezza alimentare.

Per tale motivo occorre prendere in considerazione la produzione, il trasporto e la distribuzione dei mangimi con i quali vengono nutriti gli animali destinati alla produzione di alimenti per l'uomo, compresa la produzione di animali che potrebbero essere utilizzati come mangimi negli allevamenti di pesci, per il fatto che contaminazioni accidentali o intenzionali dei mangimi, adulterazioni o pratiche fraudolente o altre pratiche scorrette in relazione ad essi possono avere incidenza diretta o indiretta sulla sicurezza degli alimenti. Per lo stesso motivo occorre prendere in considerazione altre pratiche e mezzi di produzioni agricoli a livello di produzione primaria e i loro effetti potenziali sulla sicurezza generale degli alimenti.

L'imposizione ci viene dall'UE che recentemente, oltre al già citato Regolamento (CE) n. 178/2002, ha provveduto all'emanazione di altri quattro regolamenti e precisamente: il Regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004 "sull'igiene dei prodotti alimentari" (GUCE L 226, 25.06.2004), il Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, "che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per

gli alimenti di origine animale” (GU L 13, 30.04.2004), il Regolamento (CE) n. 854 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004 “che stabilisce norme specifiche per l’organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano” (GUCE L 139, 30.04.2004) e il Regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004 “relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali” (GUCE L 191, 28.05.2004). Questi regolamenti, che costituiscono il così detto “pacchetto igiene”, sono stati integrati prima dal Regolamento (CE) n. 183/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 12 gennaio 2005 “che stabilisce requisiti per l’igiene dei mangimi” (che fissa norme generali in materia di igiene dei mangimi, condizioni e disposizioni atte ad assicurare la rintracciabilità dei mangimi, condizioni e disposizioni per la registrazione e il riconoscimento degli stabilimenti) e successivamente dal Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione, del 15 novembre 2005, relativo ai “criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari” (GUCE L 338, 22.12.2005) e dal Regolamento (CE) n. 2075/2005 della Commissione, del 5 dicembre 2005, che definisce “norme specifiche applicabili ai controlli ufficiali relativi alla presenza di trichine nelle carni” (GUCE L 338, 22.12.2005).

Per quanto riguarda l’impiego dei farmaci per uso veterinario devono essere presi in considerazione due decreti legislativi di recente emanazione: il Decreto Legislativo (D. L.gs) n. 158 del 16 marzo 2006 “Attuazione della direttiva 2003/74/CE, concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali” (GURI n. 98, 28.04.2006) riguardante oltre al divieto di utilizzare talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali, anche le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti e il D. L.gs n. 193 del 6 aprile 2006 “Attuazione della direttiva 2004/28/CE recante codice comunitario dei medicinali veterinari” (GURI n. 121, 26.05.2006), relativo appunto al codice comunitario dei medicinali veterinari da applicare ai medicinali veterinari, incluse le premiscele per alimenti medicamentosi, destinati ad essere immessi in commercio e preparati industrialmente o nella cui fabbricazione interviene un processo industriale. Le norme di questo decreto legislativo, salvo talune previste eccezioni, si applicano anche ai medicinali veterinari omeopatici.

In ambito di queste fattispecie deve essere rivalutata la situazione dell’impresa zootecnica. Nel contesto sono state coniate diverse definizioni finalizzate tutte a richiamare l’attenzione di chi produce e di coloro ai quali le produzioni sono destinate, cioè i consumatori.

È noto che nella conduzione di un’azienda zootecnica giocano un ruolo molto importante i molteplici rischi derivanti dall’uso di foraggi e di mangimi, sostanze per migliorare l’utilizzazione dei nutrienti. Da sottolineare inoltre che l’evoluzione tecnologica dei sistemi produttivi, con l’impiego talora anche massiccio di sostanze farmacologiche, ha fatto emergere una serie di problemi relativi all’impatto ambientale, al benessere animale, alla tutela della sicurezza degli operatori e spesso anche a situazioni di farmacoresistenza. Si tratta di tematiche che impongono di rivoluzionare le metodiche produttive al fine di garantire nel contempo qualità e accettabilità dei

prodotti stessi. Particolare rilievo, in questa realtà, deve essere attribuito agli aspetti che riguardano l'ecocompatibilità e la sicurezza delle derrate destinate alla alimentazione umana. Nella conduzione di un'azienda zootecnica non bisogna infine sottovalutare i vincoli imposti dalla recente direttiva sui nitrati per le paventate conseguenze sulla filiera dell'agroalimentare.

Residui di sostanze xenobiotiche e Piani Nazionali per la Ricerca (PNR) sugli animali da reddito, nei loro prodotti e relativi provvedimenti normativi.

Eventi contaminanti gli animali possono verificarsi con molteplici modalità ed in differenti situazioni. Una via di contaminazione è rappresentata sicuramente dalla via orale dato che sostanze tossiche di natura ambientale possono essere veicolate con i mangimi o l'acqua di bevanda. Le cause più frequenti sono riconducibili a contaminazione ambientale aerogena, diretta per deposito di materiale contaminante sui vegetali, o indiretta, per la penetrazione del tossico nella pianta dovuto alla sua assimilazione per via radicale. Altre vie di contaminazione sono quella acquatica diretta, per abbeveraggio, o indiretta, per l'irrigazione di foraggi con acque contaminate da diossina, PCB, pesticidi, composti organofosforati, erbicidi, insetticidi organoclorurati. Ulteriori vie di contaminazione sono imputabili ad errori nel trattamento di derrate fresche o a errate miscelazioni o erronee conservazioni (che portano allo sviluppo di mico-tossine) dei mangimi.

Altri rischi sono rappresentati dalla presenza di residui di medicinali veterinari tanto che nel 1990 la Comunità Europea emanava il Regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio, del 26 giugno 1990, che definiva "una procedura comunitaria per la determinazione dei limiti massimi di residui (MRL) di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale", (GUCE n. L 224, 18/08/1990) fissando in quattro allegati le diverse molecole utilizzabili o meno in funzione dei relativi MRL.

Il rischio residui, che implica un problema di farmacovigilanza sia a livello di allevamento che di macello, ha dato l'avvio prima ai piani nazionali per la ricerca residui per quanto attiene i farmaci veterinari (PNR) e da qualche anno ai piani nazionali di vigilanza e controlli sanitari sulla alimentazione animale (PNAA).

Il PNAA attualmente è strutturato in cinque capitoli così suddivisi:

- Capitolo 1: piano di monitoraggio ai fini della profilassi della BSE;
- Capitolo 2: piano di monitoraggio per il controllo di principi attivi e additivi (ammessi e non negli alimenti per animali):
 - Capitolo 3: piano di monitoraggio per il controllo della frequenza dell'incidenza e delle concentrazioni delle sostanze indesiderabili e dei contaminanti negli alimenti per animali: PCB, diossina - simili, micotossine, metalli pesanti;
 - Capitolo 4: piano di monitoraggio per la valutazione della contaminazione microbica da salmonella spp dei mangimi composti e delle materie prime per mangimi di origine vegetale;
 - Capitolo 5: piano di monitoraggio sulla presenza di organismi geneticamente modificati nei mangimi.

Considerazioni conclusive

L'evoluzione tumultuosa del sistema agricolo-zootecnico dagli anni '60 in poi rappresenta la conseguenza della così detta "rivoluzione verde", finalizzata sempre alla ricerca di una maggior disponibilità di cereali. Accanto a questa evoluzione si è contemporaneamente sviluppata l'introduzione di nuove tecnologie proiettate a programmare e realizzare moderni sistemi agroindustriali mediante l'impiego di additivi che, se da un lato hanno consentito di soddisfare precise richieste di quantità, dall'altro hanno posto concreti problemi di qualità e di sicurezza delle produzioni. L'imprenditore zootecnico deve quindi conoscere ed attenersi a precise disposizioni previste dal legislatore nei regolamenti sopra citati e ormai attivati.

Per quanto attiene gli obblighi generali di competenza degli addetti ad organizzare i controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali, il Regolamento (CE) n. 882/2004 all'art. 3 prevede che i controlli ufficiali "siano eseguiti periodicamente in base ad una valutazione dei rischi e con frequenza appropriata tenendo conto dei rischi identificati associati con gli animali, con i mangimi o con gli alimenti o con qualsiasi trasformazione, materiale, sostanza, attività o operazione che possano influire sulla sicurezza dei mangimi o degli alimenti, sulla salute o sul benessere degli animali".

Il problema è stato presentato e discusso a Modena in un recente convegno sulla sicurezza alimentare con particolare attenzione alla categorizzazione del rischio e "come aspetto qualificante il gruppo di lavoro della Regione Emilia-Romagna ha ritenuto di affrontare un modello per la categorizzazione del rischio non solo per gli impianti riconosciuti ma di allargare anche l'indagine alla produzione primaria agricola; alla produzione primaria allevamento; alla lavorazione prodotti non processati/trasformati (riconosciuti e non); alla distribuzione, commercializzazione, trasporto; agli alimenti per animali; ai sottoprodotti di origine animale". L'obiettivo è sicuramente encomiabile dal momento che il legislatore considera l'argomento "sicurezza alimentare" nella globalità della catena alimentare non solo, ma il mercato dei prodotti di origine zootecnica deve tener sotto stretta osservazione quattro parametri riguardanti l'ambiente, l'industria di trasformazione, le modalità di distribuzione ed il consumatore, fattori strettamente correlati. L'azienda zootecnica deve tener conto di ognuno di questi parametri, disattenderne anche uno soltanto significa necessariamente crisi dell'impresa e sua espulsione dal mercato.

DOSAGGIO DELLA VITAMINA E NELLE CARIOSSIDI DI ALCUNE VARIETÀ DI MAIS

VITAMIN E ASSESSMENT IN SOME CORN BREEDS GRAINS

Quarantelli A.¹, Righi F.¹, Renzi M.¹, Strozzi L.², Romanelli S.¹

PAROLE CHIAVE:

Vitamina E, varietà di mais, biopotenza antiossidante relativa.

KEY WORDS:

Vitamin E, corn breeds, relative antioxidant biopotency.

Riassunto

Su 10 varietà di mais ibridi, coltivate in parcelle sperimentali, è stato valutato il tenore di vitamina E. Lo studio è stato condotto con l'obiettivo di individuare varietà che possano risultare più adatte all'alimentazione animale e più resistenti ai processi di ossidazione degli olii durante lo stoccaggio.

Il contenuto medio di α -tocoferolo è risultato pari a 9,47 mg/kg di SS con un campo di variabilità compreso fra 2,19 e 15,64, mentre i valori medi di β + γ -tocoferoli sono risultati pari a 35,24 mg/kg di SS con valori minimo e massimo rispettivamente di 18,07 e 67,33 mg/kg di SS.

La valutazione della biopotenza antiossidante relativa (RAB) ha consentito di individuare quattro varietà, contrassegnate con i n.ri 6, 8, 9, 10, le quali risultano più rispondenti con gli obiettivi della ricerca.

Summary

Vitamin E level was evaluated on 10 corn breeds. The study was performed to characterize the more suitable corn breeds for feeding animals such as breeds more resistant to oil oxidation process during stocking period.

Average content of α -tocopherol was 9.47 mg/kg of DM with a range of variation between 2.19 and 15.64, while mean value of β + γ -tocopherols was 35.25 mg/Kg of DM with minimal and maximal values of 18.07 and 67.33 mg/kg of DM respectively.

Relative antioxidant bio potency (RAB) evaluation has concurred to characterize four varieties, marked 6, 8, 9, 10, which resulted more consistent with the objectives of the research.

¹ Dipartimento di: Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti.

² Sezione di Scienza degli Alimenti e della Nutrizione.

Indirizzo per corrispondenza: afro.quarantelli@unipr.it

Introduzione

Il termine “Vitamina E” viene utilizzato per individuare due gruppi di molecole liposolubili, i **tocoferoli** ed i **tocotrienoli**. Queste molecole si caratterizzano per la loro azione antiossidante sulla componente lipidica delle membrane biologiche proteggendole dai perossidi e dai radicali dell’ossido nitrico (Christen et al., 1997).

I **tocoferoli** ed i **tocotrienoli** sono sintetizzati in natura dai vegetali superiori, dalle alghe e da alcune piante non fotosintetiche ma non dagli animali (Threlfall, 1971) e si trovano, soprattutto sotto forma di alcoli liberi, nei tessuti fogliari e nella parte lipidica dei semi. La loro ripartizione nei vegetali è legata alla specie, alla varietà, allo stato di maturazione ed ai metodi di raccolta e di conservazione (Peterson, 1995). La funzione di queste molecole è stata posta in relazione con l’elevato contenuto di acidi grassi poliinsaturi (PUFA) presenti nelle specie vegetali. Lange (1950) ha dimostrato che la concentrazione dei tocoferoli e dei tocotrienoli è positivamente correlata con la presenza dell’acido linoleico (C18:2) e dell’acido linolenico (C18:3) nella componente lipidica dell’alimento stesso. Successivamente Booth (1964) ha messo in evidenza che la Vitamina E, nelle specie vegetali, agisce come antiossidante proteggendo questi acidi grassi poliinsaturi dall’auto-ossidazione. Fattori quali l’essiccazione, lo stoccaggio e l’aggiunta di conservanti riducono il contenuto naturale di Vitamina E presente negli alimenti di origine vegetale. Per questo foraggi ed altri alimenti freschi fanno registrare tenori di vitamina E più elevati di quelli conservati. La differenza assume proporzioni tanto più marcate quanto più lungo è il periodo di conservazione.

Keitel (1979) ha riscontrato che un mais umido dopo due mesi di stoccaggio ha denunciato una perdita di Vitamina E oscillante intorno al 75%.

Bieber-Wlaschny (1988) ha potuto accertare che negli insilati di mais il processo di distruzione della Vitamina E inizia già una settimana dopo l’insilamento.

I tocoferoli e i tocotrienoli pur avendo strutture chimiche molto affini si caratterizzano per attività biologiche profondamente diverse in funzione del grado di metilazione dell’anello aromatico presente in entrambe le molecole. In base al grado di metilazione i tocoferoli sono stati suddivisi in quattro gruppi denominati **alfa**, **beta**, **gamma** e **delta**, mentre i tocotrienoli sono stati classificati solo come **alfa** e **beta**. I tocoferoli sembrano in grado di svolgere una funzione antiossidante più importante rispetto ai tocotrienoli. A questi ultimi è infatti riconosciuta una attività oscillante intorno al 16% rispetto ai primi.

Sia i tocoferoli sia i tocotrienoli possono donare un idrogeno ad un radicale libero che si forma durante la perossidazione dei lipidi (Cheeseman et Slater, 1993). L’azione antiossidante dei tocoferoli tuttavia sembra essere diversificata a seconda delle condizioni in cui questi si trovano. L’ **α -tocoferolo** sembra svolgere la sua funzione principalmente nei tessuti animali proteggendo dall’ossidazione gli acidi grassi poliinsaturi (PUFA) contenuti nei fosfolipidi delle membrane cellulari e soprattutto di quelle sub-cellulari a livello di mitocondri (Taylor, Lamden et Tappel 1976). Al **γ -** e **δ -tocoferolo** è riconosciuto invece un ruolo particolarmente importante nella prevenzione e nel rallentamento dell’ossidazione dei grassi e degli olii nelle loro sedi di accumulo e nel sistema alimentare (McLaughlin et Weirauch 1979; Bauernfeind,

1980; Wagner et al., 2004).

Alcune sperimentazioni sono state condotte per valutare il ruolo svolto dalle varie forme di tocoferoli nella prevenzione del processo di ossidazione. Yoshida et Takagi (1996) hanno osservato che soia integrale sottoposta a tostatura con microonde per 20 minuti ha evidenziato una riduzione dei tocoferoli oscillante intorno al 20%. L'aggiunta di **alfa**, **beta**, **gamma** o **delta** tocoferoli a sego e lardo, dopo riscaldamento con microonde per 0, 4, 8, 12 e 20 minuti, ha consentito a Yoshida et al. (1992) di verificare perdite di attività che sono risultate particolarmente elevate per l'**alfa tocoferolo** ed in misura decrescente per il **gamma**, il **beta** e il **delta** tocoferolo. Osservazione analoga è stata riportata da Surai (1999), il quale ha annotato, in presenza di acido linoleico e di fattori ossidanti, la scomparsa, nell'ordine, di **alfa**, **gamma** e **delta** tocoferolo.

La molecola dell' **α -tocopherolo** si differenzia infatti da quelle degli altri tocoferoli e dai tocotrienoli per la presenza, nell'anello aromatico, di tre gruppi metilici i quali conferiscono alla molecola stessa una spiccata attività di antiossidante biologico. Leth et Sondergaard (1977) a seguito di ricerche condotte sui ratti hanno attribuito una **relativa biopotenza antiossidante** pari a 100, 56, 16 e 0,5% rispettivamente all'**alfa**, al **beta**, al **gamma** e al **delta** tocoferolo. Quest'ordine è stato successivamente condiviso da Surai (1999) il quale, in aggiunta, afferma che la stabilità delle differenti forme di vitamina E presente negli alimenti è inversamente proporzionale alla attività antiossidante dei medesimi.

Janiszowska et Pennok nel 1976 hanno messo in evidenza che nei vegetali sono presenti vie metaboliche distinte per la sintesi dei tocoferoli e dei tocotrienoli. Successivamente altre ricerche (McDowell (1989), Lynch (1996), White et Xing (1997), Kurilich et Juvik (1999), Goffman et Bohme (2001)) hanno dimostrato che varietà diverse di mais ibridi sintetizzano differenti quantità di tocoferoli in funzione del loro patrimonio genetico.

In tale contesto è stato ritenuto interessante istituire una ricerca avente le seguenti finalità:

a - approfondire le conoscenze in merito al tenore di Vitamina E presente in campioni di granello di mais appartenente a linee genetiche diverse;

b - condurre una indagine preliminare per creare le basi per una ricerca più dettagliata e finalizzata ad individuare cultivar di mais dotate di un corredo di tocoferoli in grado di rallentare il più possibile il processo di ossidazione della componente lipidica durante lo stoccaggio.

Materiali e metodi

Sono state esaminate 10 varietà di mais ibridi coltivati in parcelle sperimentali appositamente allestite nell'annata 2004.

Sui campioni di granello, contrassegnati con i numeri dall'1 al 10, si è provveduto alla determinazione, condotta in doppio, del tenore di vitamina E.

Il dosaggio della vitamina E è stato effettuato mediante HPLC in *fase inversa*. Tale procedura analitica ha consentito di ottenere per ciascun campione, i tenori in alfa- e delta-tocopherolo, mentre per il beta- ed il gamma-tocopherolo, è stato determina-

to solo il valore della loro somma in quanto i relativi picchi vengono coeluiti (Tan et Brzuskiwicz (1989); Abidi (2000)). I campioni sono stati sottoposti a saponificazione con KOH in ambiente metanolico a 70°C e successivamente ad estrazione liquido-liquido con etere di petrolio. Gli estratti sono stati portati a secchezza in rotavapor a 45°C, ripresi con metanolo e quindi iniettati in HPLC, con colonna C18, eluente metanolo 100%, flusso 1.5 ml/min., loop da 20 µl. Il rivelatore dispone di una microcella da 1.2 µl e la lettura è stata effettuata ad una lunghezza d'onda pari 294 nm.

I dati raccolti sono stati elaborati con la finalità di valutare “**la biopotenza antiossidante relativa**” (**RAB - relative antioxidant biopotency**) proposta da Leth et Sondergaard (1977); in particolare sono state calcolate la RAB della Vitamina E e la RAB della Vitamina E presente per kg di Sostanza Secca di mais.

Risultati e discussione

Il tenore di Vitamina E presente nella componente lipidica dell'olio di mais è da tempo oggetto di studio per il ruolo che viene riconosciuto alla medesima vitamina. Alcune indicazioni bibliografiche relative ai tenori di tocoferolo totale nonché dei singoli omologhi sono riportati nelle tabella n. 1. Come osservato da Kurilich et Juvik (1999) i tenori di tocoferoli nelle cariossidi di mais appartenenti a cultivar diverse presentano una elevata variabilità verosimilmente attribuibile alle differenze genetiche che intercorrono fra le medesime, al grado di maturità della granelle al momento delle analisi ed al relativo contenuto di sostanze grasse.

Tabella 1:

Tenori in tocoferoli del mais (mg/kg di alimento secco).

References	α-tocoferolo	β+γ-tocoferolo	δ-tocoferolo	Totale tocoferoli	Rapporto β+γ / α
McDowell 1989	6,0	38,0	-----	44,0	6,33
Lynch 1996	20,0	15,0	-----	35,0	0,75
White et Xing 1997	13,7	46,1	-----	59,8	3,36
Kurilich et Juvik 1999	1,43 - 32,54	2,37 - 63,28	0,20 - 4,27	7,24 - 85,62	-----
Goffman et Bohme 2001	2,91 - 12,01	29,97 - 45,98	0,52 - 3,09	33,58 - 58,46	-----

In considerazione dell'elevata biopotenza antiossidante riconosciuta all'α-tocoferolo, l'esame del rapporto $\beta + \gamma / \alpha$ evidenziato dai diversi Autori può rappresentare un valido elemento di discriminazione ai fini della nutrizione animale. È evidente infatti come, a parità di tocoferoli totali, una riduzione di questo rapporto sia indicativo di una maggiore biopotenza antiossidante della Vitamina E contenuta nell'alimento.

In questo contesto la possibilità di separare le diverse frazioni della Vitamina E appare essenziale nella valutazione della reale efficacia della stessa nel contrastare l'azione dei radicali liberi negli organismi animali.

I risultati emersi dalle analisi condotte sui campioni di granella di mais oggetto delle nostre indagini sono compendati nella tabella n. 2.

Tababella 2:

Tenori di tocoferoli riscontrati nei campioni di mais analizzati (mg/kg di S.S.).

Campioni n.ro	α - tocoferolo	$\beta+\gamma$ - tocoferolo	Totale tocoferoli	Rapporto $\beta+\gamma / \alpha$	Biopotenza Antiossidante Relativa per la Vitamina E	Biopotenza Antiossidante Relativa per kg di mais
1	9,75	20,82	30,57	2	43,02	13,15
2	8,48	22,47	30,95	3	39,25	12,15
3	7,76	23,09	30,85	3	37,39	11,54
4	8,02	26,96	34,98	3	35,51	12,42
5	7,26	31,14	38,40	4	32,15	12,35
6	9,45	49,44	58,89	5	29,76	17,53
7	2,19	67,33	69,52	31	18,98	13,19
8	15,33	37,36	62,69	2	40,68	21,43
9	10,88	55,73	66,61	5	30,00	19,98
10	15,64	18,07	33,71	1	55,15	18,59
Media	9,47	35,24	45,72	-----	36,19	15,23
Variabilità	2,19 - 15,64	18,07 - 67,33	30,57 - 69,52	-----	18,98 - 55,15	11,54 - 21,43

Dall'esame della tabella emerge quanto segue:

- **contenuto di α -tocoferolo:** il contenuto medio di α -tocoferolo delle varietà testate è risultato pari a 9,47 mg/kg di SS con un campo di variabilità compreso fra 2,19 e 15,64; tali valori collimano, in linea di massima con quanto riportato in letteratura;

- **contenuto di $\beta+\gamma$ -tocoferolo:** i tenori in $\beta+\gamma$ -tocoferoli sono sostanzialmente in accordo con quelli riportati da Kurilich et Juvik (1999), attestandosi su una media pari a 35,24 mg/kg di SS con un range di variabilità compreso fra 18,07 e 67,33;

- **contenuto di tocoferoli totali:** il range di variabilità registrato per le varietà in questione risulta inferiore a quello riportato da Kurilich et Juvik (1999) mentre appare analogo a quello riscontrato da Goffman et Bohme (2001);

- **rapporto $\beta+\gamma$ / α -tocoferoli**: il rapporto è stato calcolato con la finalità di evidenziare la prevalenza di alcuni tocoferoli rispetto ad altri. In tale contesto 6 campioni hanno evidenziato valori compresi fra 3 e 5; 3 campioni hanno fatto registrare un rapporto più ridotto compreso fra 1 e 2. Il campione n. 7 si discosta sensibilmente da tutti gli altri e denuncia un rapporto pari a 31. Tale rapporto scaturisce da tenori pari a 2,19 e 67,33 mg/kg di SS rispettivamente per α e $\beta+\gamma$ -tocoferolo;

- **la Biopotenza Antiossidante Relativa (RAB - Relative Antioxidant Biopotency)**: proposta da Leth et Sondergaard (1977) la biopotenza antiossidante relativa attribuisce un valore ottimale all' α -tocoferolo e riconosce agli altri tocoferoli attività notevolmente inferiori. Ricerche successive hanno fornito dati contrastanti in merito alla RAB verificata sperimentalmente per i vari tocoferoli (Cooney et al. (1999); Wagner et al. (2004)).

In considerazione delle difficoltà che emergono in sede di valutazione della **RAB** della Vitamina E rintracciata nelle varietà di mais è stato ritenuto utile proporre una valutazione ponderata sulla base dei tenori di tocoferoli registrati, nonostante la medesima valutazione potrebbe risultare empirica e prestarsi a molteplici interpretazioni.

All'uopo è stata utilizzata la RAB proposta da Leth et Sondergaard (1977), numericamente espressa da valori pari a 100, 56, e 16 rispettivamente per **alfa**, **beta** e **gamma** tocoferolo.

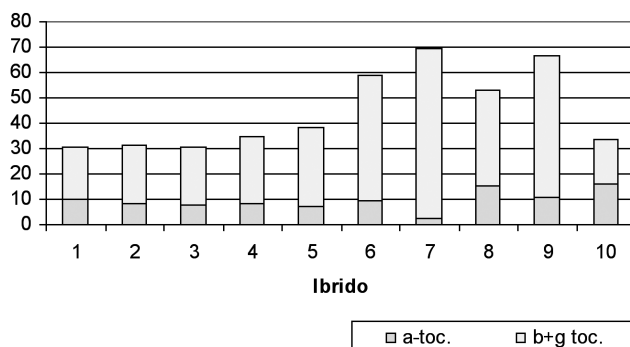
I dati raccolti sono stati elaborati con la finalità di valutare la RAB della Vitamina E e la RAB calcolata per kg di Sostanza Secca di mais.

Da questa elaborazione sono stati ricavati i dati riportati nella tabella n. 2 e raffigurati nei grafici nn. 1, 2 e 3.

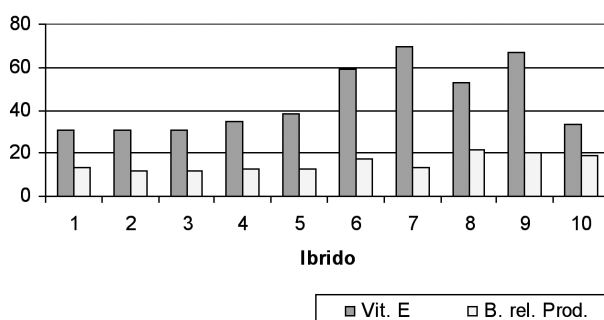
- **RAB della Vitamina E contenuta nel mais**: dall'esame dei dati ottenuti emerge che la varietà 10 si caratterizza per la presenza della Vitamina E con RAB più elevata (55,15%) mentre la cultivar contrassegnata con il n. 7, caratterizzata dal tenore di "tocoferoli totali" più elevato (69,52 mg/kg di SS), è quella che denuncia una RAB più contenuta (18,98%). Per quest'ultima varietà il basso livello di RAB trova giustificazione nel limitato apporto in α -tocoferolo (2,19 mg/kg di SS). Le rimanenti varietà evidenziano una più elevata uniformità e denunciano valori di RAB oscillanti fra il 29,76 e 43,02%.

- **RAB della Vitamina E calcolata per kg di Sostanza Secca di mais**: sono stati registrati valori di RAB compresi fra 11,54 e 21,43. In tale intervallo di variabilità la linea genetica 10, citata nella valutazione precedente per il valore più elevato, si attesta su un livello di RAB pari a 18,59 mentre la varietà 7, evidenziata per il valore più limitato fa annotare un valore pari a 13,19, in linea con le altre varietà.

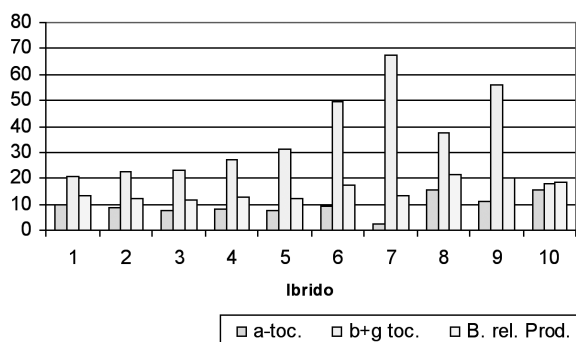
Graf. 1 - Contenuto di tocoferoli degli ibridi di mais



Graf. 2 - Contenuto di Vitamina E e Biopotenza Antiossidante Relativa del mais



Graf. 3 - Contenuto di tocoferoli e Biopotenza Antiossidante



Conclusioni

Sulla base dei risultati conseguiti e delle successive valutazioni riteniamo sia possibile affermare quanto segue:

a - le cultivar di mais testate si caratterizzano per un apporto in Vitamina E che collima in linea di massima con i tenori registrati in altre sperimentazioni;

b - i tenori di tocoferoli sono risultati diversificati fra le diverse cultivar, come ipotizzato in base alle differenze genetiche che caratterizzano le stesse; ciò ha consentito di individuare rapporti fra gli α - e β + γ tocoferoli anche di entità rilevante (cultivar 7) dovuti ad uno scarso apporto di α -tocopherolo;

c - il calcolo della RAB della Vitamina E contenuta nelle varietà di mais è risultato utile ai fini della valutazione della capacità antiossidante della stessa. Sulla base di questo parametro è possibile ipotizzare che le varietà a più elevata RAB (es. 10, 1, 8) possano trovare un impiego ottimale non solo per l'alimentazione animale ma anche per la produzione dell'olio;

d - il calcolo della RAB della Vitamina E / kg di Sostanza Secca di mais è risultato utile per individuare le varietà che possono risultare più adatte all'alimentazione animale in virtù del loro buon apporto in tocoferoli e per la loro potenziale capacità di prevenire e/o rallentare i processi di ossidazione degli olii durante lo stoccaggio. Queste caratteristiche sembrano individuabili nelle cultivar contrassegnate con i n.ri 6, 8, 9, 10;

e - le varietà 8 e 10 sembrano offrire entrambe le possibilità di impiego, a motivo della loro elevata RAB riferita alla Vitamina E e al kg di vss' di mais.

A conclusione, riteniamo che nell'ambito delle 10 varietà di mais prese in considerazione sia possibile individuarne alcune che si caratterizzano per tenori di Vitamina E degni del massimo interesse e, come tali, giustificano ulteriori e più approfondite indagini finalizzate alla ottimizzazione della filiera produttiva di questo cereale.

Bibliografia

1. Abidi S.L. (2000) - Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. J. Chromatogr. A., 881, 197-216.
2. Bauernfeind J. (1980) - in Vitamin E: A Comprehensive Treatise, ed. Machlin L.J. (Dekker, New York), pp 99-165.
3. Bieber-Wlaschny M. (1988) - Importanza della vitamina E nell'alimentazione della bovina da latte. F. Hoffman-La Roche - Basilea.
4. Booth, V. H. (1964) - The rise in tocopherol content in wilting and in non-illuminated leaves. Phytochemistry, 3, 273.

5. Cheeseman K.H., Slater T.F. (1993) - An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, 49, 481-493.
6. Christen S., Woodall A. A., Shigenaga M.K., Southwell-Keely P.T., Duncan M.W., Ames B.N. (1997) - γ -Tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO_x and compliments α -tocopherol: physiological implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 3217-3222.
7. Cooney R.V., Franke A.A., Harwood P.J., Hatch-Pigott V., Custer L.J., Mordan L.J. (1993) - γ -Tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: Superiority to α -tocopherol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1771-1775.
8. Goffman F.D., Bohme T. (2001) - Relationship between fatty acid profile and Vitamin E content in maize Hybrids (*Zea mays* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4990-4994.
9. Janiszowska W., Pennok J.F. (1976) - The biochemistry of vitamin E in plants. *Vitam. Horm.*, 34, 77-105.
10. Keitel K. (1979) - Untersuchungen zur Veränderung der Lipide und des Tokopherolmusters von Körnermais nach unterschiedlicher Konservierung und Lagerung. Dissertation, Honhenheim.
11. Kurilich A.C., Juvik J.A. (1999) - Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *J. Agric. Chem.*, 47, 1948-1955.
12. Lange W. (1950) - Cholesterol, phytosterol and tocopherol content of food products and animal tissue. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 29, 414.
13. Leth T. and Sondergaard H. (1977). Biological activity of vitamin E compounds and natural materials by the resorption-gestation test, and chemical determination of the vitamin E activity in foods and feeds. *J. Nutr.* 107: 2236-2243.
14. Lynch G.L. (1996) - Natural occurrence and content of vitamin E in feed-stuffs. In: Coelho M.B. ed. *Vitamin E in animal nutrition and management*. A. BASF Reference Manual., 51-56.
15. McDowell L.R. (1989) - Vitamins in animal nutrition. Comparative aspects to human nutrition. Academic Press, Inc. San Diego.
16. McLaughlin P.J. and Weihrauch J.L. (1979) - Vitamin E content of foods. *J Am Diet Assoc.*, 75: 647-665.
17. Peterson D.M. (1995) - Oat tocopherols - concentration and stability in oat products and distribution within the kernel. *Cereal Chemistry*, 72, 21-24.
18. Surai P.F. (1999) - Vitamin E in Avian Reproduction. *Poultry and Avian Biology Reviews*, 10, 1-60.
19. Tan B., Brzuskiwicz L. (1989) - Separation of tocopherol and tocotrienol isomers using normal- and reverse-phase liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 180, 368-373.
20. Taylor S.L., Lamden M.P. and Tappel A.L. (1976) - Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. *Lipids*, 2 530-538.
21. Threlfall D.R. (1971) - The biosynthesis of vitamins E and K and related compounds. *Vitam. Horm.*, 29, 153-200.
22. Yoshida H., Takagi S. (1996) - Vitamin E and oxidative stability of soya bean oil prepared with beans at various moisture contents roasted in a microwave

- oven. J. Sci. Food Agric. 72, 1, 111-119.
23. Yoshida H., Tatsumi M., Kajimoto G., (1992) - Influence of fatty acids on the tocopherol stability in vegetable oils during microwave heating. J. Am. Oil Chem. Soc., 69, 119-125.
 24. Wagner K.H., Isnardy B., Elmadfa I. (2004) – γ - and δ -tocopherols are more effective than α -tocopherol on the autoxidation of a 10% rapeseed oil triacylglycerol-in-water emulsion with and without a radical initiator. European Journal of Lipid Science and Technology Vol. 106, Issue 1, 2004. Pages 44-51.
 25. White P.J., Xing Y. (1997) - Antioxidants from cereals and legumes. In: Shaidi F., ed. Natural Antioxidants. Chemistry health effects and applications. 25-63 AOCS PRESS Champaign.

INTEGRAZIONE VITAMINICA DELLA BOVINA IN ASCIUTTA E PROPRIETÀ IMMUNIZZANTI DEL COLOSTRO

VITAMIN INTEGRATION OF DRY COW AND COLOSTRUM IMMUNIZING PROPERTIES

Righi F., Campi M., Romanelli S., Renzi M., Quarantelli A.

PAROLE CHIAVE:

vitello, colostro, siero, stato immunitario.

KEY WORDS:

calf, colostrum, serum, immune system.

Riassunto

La somministrazione di colostro di ottima qualità è fondamentale per garantire l'acquisizione della immunità passiva al vitello. Diversi studi hanno dimostrato che la nutrizione e l'alimentazione della bovina in asciutta possono condizionare la capacità immunizzante del colostro.

Scopo del presente lavoro è stato quello di determinare l'influenza dell'integrazione vitaminica della razione con diversi livelli di vit. A, D₃ ed E nella vacca in asciutta sulle proprietà immunizzanti del colostro e sul trasferimento dell'immunità passiva al vitello. Ai livelli considerati, l'integrazione con vitamine A, D₃ ed E nel periodo di asciutta sembra non influenzare la qualità immunizzante del colostro. I casi di FPT sono risultati considerevolmente aumentati quando la concentrazione colostrale di immunoglobuline (Ig) era inferiore a 50g/l, anche se alcuni fallimenti del trasferimento dell'immunità passiva sono stati riscontrati anche in presenza di colostri contenenti livelli di Ig maggiori a 100 g/l. Il mancato trasferimento dell'immunità potrebbe pertanto dipendere anche da una errata tecnica di somministrazione del colostro.

Summary

Good quality colostrum administration is crucial to ensure passive immunity to neonatal calf. Several researches have demonstrated that dry cow nutrition and rationing may affect colostrum immunizing properties.

The aim of this work was to study the effects of different levels of vitamin A, D₃ and E inclusion in dry cow ration on colostrum immunizing properties and on pas-

sive immunity transfer to calf. At the levels considered, vitamin A, D₃ and E inclusion in dry cow diet had no effect colostrum properties. FPT prevalence increased when immunoglobulin (Ig) level was lower than 50g/l, even if failure of passive transfer was registered also with colostrum containing more than 100 g/l of Ig. Failure of passive transfer can depend also from a incorrect colostrum feeding practice.

Introduzione

Una corretta alimentazione della vacca in fase di asciutta può prevenire patologie metaboliche nel post-partum e può influenzare e migliorare la produzione di colostro. Per il vitello neonato, la fase colostrale (prime 48h di vita) è un momento fondamentale ai fini della acquisizione della immunità passiva; occorre infatti garantire all'animale una copertura anticorpale adeguata, in grado di proteggerlo dall'attacco di eventuali patogeni. A tal fine è necessario fornire al vitello un colostro di buona qualità (IgG $\geq$ 50 g/l) in giusta quantità, ossia almeno 4 litri nelle prime 12h di vita (Quigley, 2001). Diversi lavori hanno affrontato la tematica della gestione dell'alimentazione della vacca da latte nel periodo di asciutta al fine di ottenere un miglioramento qualitativo del colostro. Alcuni studi, condotti al fine di valutare gli eventuali effetti derivanti da restrizioni del livello energetico e proteico della razione della bovina in asciutta sul colostro (Hough et al., 1990), hanno dimostrato come bovine sottoposte ad un regime proteico ristretto producano un colostro che non differisce qualitativamente da quello ottenuto da bovine alimentate correttamente; i livelli di immunoglobuline sieriche dei vitelli, nonostante un minor assorbimento enterico, non hanno mostrato variazioni significative.

Franklin et al. (2005) hanno valutato gli effetti della somministrazione dei MOS (Mannan Oligo Saccharides) in animali immunizzati nei confronti di Rotavirus. Le bovine trattate hanno mostrato un titolo anticorpale superiore a quelle non trattate. Anche se la somministrazione di MOS non ha influenzato né la quantità né la qualità del colostro, i vitelli figli delle vacche trattate presentavano un titolo di anticorpi superiore rispetto al gruppo di controllo; ciò sembrerebbe indicare che i MOS possano migliorare il trasferimento di immunità passiva dalla madre al neonato. In uno studio analogo condotto su vacche da latte (Quarantelli et al., 2004) sono stati valutati gli effetti esercitati da una supplementazione di Vitamina E sulle caratteristiche del colostro riscontrando un aumento dell' α -tocoferolo sia plasmatico sia colostrale, ma nessuna influenza sul tenore di immunoglobuline colostrali e sieriche nel vitello. Sikka et al. (2002) hanno somministrato un complesso vitaminico (A+D₃+E) ad un gruppo di bufale di razza Murrah, registrando un aumento delle immunoglobuline colostrali; anche le concentrazioni di diversi minerali, in particolare Ca, Mg e Zn, hanno mostrato nel gruppo trattato un innalzamento significativo.

Sulla base di quanto riportato in letteratura, risulta quindi evidente che esistono interazioni di ordine metabolico e/o immunitario fra la nutrizione della bovina in asciutta e il contenuto di immunoglobuline del colostro. Scopo del presente lavoro è valutare gli effetti della integrazione della dieta della bovina in asciutta con le vitamine A, D₃ ed E sulle proprietà immunizzanti del colostro.

Materiali e metodi

Disegno sperimentale e campionamenti

L'indagine è stata condotta presso 5 allevamenti di bovine da latte (A, B, C, D, E) di razza Frisona Italiana siti in provincia di Parma nel periodo ottobre-dicembre 2005. Presso le aziende considerate venivano adottate razioni analoghe durante il periodo di asciutta per quanto riguarda l'apporto di foraggi e concentrati; quest'ultimi, in particolare, erano mangimi per vacche in asciutta aventi la stessa composizione chimica, ma diversificati in relazione al contenuto di vitamina A, D ed E (Tabella 1).

In corrispondenza dei parti, sono stati raccolti campioni di colostro e campioni ematici sono stati prelevati dai vitelli fra le 24 e le 48 ore dalla nascita. Sono stati inoltre registrati l'ordine di parto della bovina ed la lunghezza del periodo di asciutta.

In particolare, i campioni di colostro sono stati raccolti in concomitanza con la prima mungitura, avvenuta entro le prime 5 ore successive al parto, stoccati in appositi contenitori, congelati e conservati a -20°C fino al momento delle analisi.

Tabella 1: Razionamenti e integrazioni adottati presso le aziende considerate.

Azienda	Tipo e quantità di foraggi (Kg/capo/di)	Quantità di mangime (Kg/capo/di)	Vitamina A (UI/Kg di mangime)	Vitamina D ₃ (UI/Kg di mangime)	Vitamina E (mg/Kg di mangime)
A	Polifita (12kg)	3	17000	10000	500
B	Polifita (12-15 Kg)	3	25500	2500	20.5
C	Polifita (12-15 Kg)	3	18000	1800	30
D	Graminacee (ad libitum)	3	125000	7380	520
E	Polifita (7Kg) + erba medica (2Kg)	3	130000	7920	500.02

I campioni ematici sono stati prelevati dalla vena giugulare tra la 24^a e la 48^a ora di vita del vitello; il sangue è stato raccolto con provette Vacutainer® da 10 ml prive di anticoagulante e lasciato a riposo a temperatura ambiente per 12 ore. Ogni campione è stato centrifugato a 3000 giri/min per 7 minuti, posto in una provetta e conservato a -20°C fino al momento delle analisi.

Valutazione delle proprietà immunizzanti del colostro

Per la valutazione delle proprietà immunizzanti del colostro è stato utilizzato il colostrometro (Colostrometer™ by Biogenics), come descritto da Quigley (1998).

I campioni di colostro sono stati scongelati in bagnomaria e portati ad una temperatura di 20°C; 250 ml di colostro sono stati posti all'interno di un cilindro graduato da 500 ml. Dopo alcuni secondi dall'introduzione del colostrometro, in seguito al raggiungimento della posizione di equilibrio, si è proceduto alla lettura della concentrazione anticorpale stimata per ciascun campione.

Determinazione del livello anticorpale sierico

I campioni di siero sono stati scongelati a bagnomaria ad una temperatura di 20°C e successivamente agitati per circa dieci secondi tramite vortex. La valutazione del livello anticorpale è stata effettuata attraverso il test del FTP descritto da Hopkins et al. (1984), basato sulla precipitazione degli anticorpi sierici con Solfito di Sodio Anidro.

La lettura è stata effettuata a vista su campo oscuro, secondo quanto previsto dalla metodica, sulla base del grado di intorbidimento osservato in seguito alla introduzione del siero nelle apposite soluzioni saline. È stata attribuita negatività al test di FPT in caso di intorbidimento evidente e positività in assenza di intorbidimento. In caso di lieve precipitazione il test è stato considerato dubbio.

Elaborazione statistica dei dati

L'analisi statistica dei dati è stata condotta con il metodo ANOVA, servendosi del software SPSS vers. 14.0.

I dati raccolti relativamente al contenuto di immunoglobuline del colostro sono stati valutati al fine di individuare eventuali relazioni di questo parametro con l'apporto vitaminico alimentare ricevuto dalle bovine in asciutta. Lo stesso parametro è inoltre stato studiato in relazione al numero di lattazioni effettuate dalle bovine partorienti ed alla lunghezza del periodo di asciutta. I dati relativi alla manifestazione di FPT (Failure of Passive Transfer) sono stati valutati in relazione al contenuto colostrale di immunoglobuline.

Risultati e discussioni

Il contenuto medio di immunoglobuline nei colostri oggetto dell'indagine è risultato compreso fra 83,88 g/l (azienda D) e 94,22 g/l (azienda A) (Tabella 2). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata fra le varie aziende testate per quanto riguarda la concentrazione delle immunoglobuline nel secreto mammario. Inoltre, nessuna correlazione significativa è stata individuata fra i livelli delle vitamine somministrate e la qualità immunizzante del colostro. Tali rilievi appaiono in accordo, per quanto concerne l'apporto di vitamina E, con quanto precedentemente riscontrato da Quarantelli et al. (2004). Più difficoltoso risulta il confronto con i risultati ottenuti da Sikka et al. (2002), in quanto tale studio era volto alla valutazione dell'effetto di dosi supplementari di tutte le vitamine considerate contestualmente.

Ai livelli sperimentali considerati, l'integrazione vitaminica (A, D₃ ed E) della dieta della vacca da latte in fase di asciutta sembrerebbe pertanto non influenzare il contenuto anticorpale del colostro.

Tabella 2: Integrazioni vitaminiche adottate presso le diverse aziende e qualità immunizzante del colostro.

Azienda	Vitamina A (UI/Kg di mangime)	Vitamina D3 (UI/Kg di mangime)	Vitamina E (mg/Kg di mangime)	Qualità del campione (Ig, g/ml)	n
A	17000	10000	500	94.22 ± 16.26	9
B	25500	2500	20.5	92.50 ± 36.03	8
C	18000	1800	30	76.42 ± 23.66	7
D	125000	7380	520	83.88 ± 28.83	17
E	130000	7920	500.02	89.80 ± 19.87	15

L'ordine di lattazione è risultato invece essere un fattore in grado di influenzare in maniera significativa la qualità del colostro in termini di contenuto di immunoglobuline, come mostrato in Tabella 3. In particolare, la concentrazione di immunoglobuline sembra incrementare in misura proporzionale all'ordine di lattazione. Tale riscontro è in linea con quanto rilevato da Jardon et al. (1999), il quale ha individuato tenori medi di immunoglobuline colostrali pari a 25, 37 e 47 g/l in prima, seconda e terza lattazione rispettivamente. Nel presente studio i tenori di immunoglobuline sono risultati mediamente più alti (75, 76 e 91 g/l) nelle prime tre lattazioni e differenze statisticamente significative sono state riscontrate fra il primo ed il quarto ordine di lattazione ($P < 0,05$) così come fra il secondo ed il quarto ($P < 0,01$). Una differenza significativa ($P < 0,05$) è stata riscontrata anche fra il quinto ed il sesto ordine di lattazione.

Tabella 3: Ordine di lattazione e contenuto di immunoglobuline del colostro.

Lattazione	Qualità del campione (Ig, g/ml)	n
1	75,67 ± 25,43 a	12
2	76,73 ± 29,92 c	15
3	91,78 ± 26,47	9
4	101,18 ± 21,06 bd	11
5	83,00 ± 9,90 a	2
6	104,67 ± 41,52 b	3
7	104,50 ± 20,51	2
8	95,00	1
11	114	1

a,b: $P < 0,05$; c,d: $P < 0,01$

La mancanza di differenze statisticamente significative tra gli altri ordini di lattazione possono essere attribuite al ridotto numero di campioni testati in particolare per gli ordini di lattazione più elevati. La concentrazione di immunoglobuline nel colostro e l'ordine di lattazione sono risultati positivamente (+0,406) e significativamente ($P < 0,002$) correlati.

Nessuna relazione è stata individuata fra la lunghezza della asciutta e la qualità immunizzante del colostro, analogamente a quanto osservato da Grusenmeyer et al. (2005).

La qualità del colostro è apparsa come una variabile in grado di influenzare il trasferimento dell'immunità passiva (Tab. 4). Dalle osservazioni effettuate è infatti emerso che a livelli di immunoglobuline inferiori a 50 g/l, tipiche di colostri qualitativamente scarsi (Grusenmeyer et al., 2005), la percentuale di FPT raggiunge l'80 %.

Tuttavia, fallimenti del trasferimento dell'immunità passiva, si sono verificati anche con colostri di altissima qualità ($[Ig] > 100$ g/l); in questo caso, verosimilmente, devono essere chiamati in causa altri fattori che influenzano il trasferimento della immunità passiva quali la quantità di colostro somministrata e l'intervallo di tempo intercorso fra la nascita ed il primo pasto (Nocek et al., 1984; Quigley et al., 1995; Franklin et al., 2003).

Tabella 4: Livelli di immunoglobuline colostrali e positività all'FPT.

[Ig]	FPT positivo	FPT negativo	Totale	% FPT positivo
≤ 50 mg/ml	4	1	5	80%
50-100 mg/ml	12	25	37	32%
> 100 mg/ml	7	12	19	37%

Conclusioni

I risultati emersi dalle indagini svolte sembrano escludere un ruolo della integrazione con vitamine A, D₃ ed E durante il periodo di asciutta ai fini della capacità immunizzante del colostro. L'ordine di lattazione sembra svolgere un ruolo preponderante nell'influencare questo aspetto risultando in relazione diretta con il contenuto di immunoglobuline colostrali, mentre la durata dell'asciutta non sembra modificare questo parametro.

Il livello di immunoglobuline colostrali si propone come un fattore in grado di influenzare la frequenza dei casi di FPT, che aumenta in modo considerevole quando la concentrazione di Ig è inferiore a 50 g/l. L'evenienza di FTP anche dopo somministrazione di colostro di buona qualità potrebbe trovare giustificazione in una scorretta tecnica di somministrazione dello stesso.

Bibliografia

1. Franklin S. T., D. M. Amaral-Philips, J. A. Jackson and A. A. Campbell. 2003. "Health and Performance of Holstein Calves that Suckled or Were Hand-Fed Colostrum and Were Fed One or Three Physical Forms of Starter" *Journal Dairy Science*, 86: 2145-2153.
2. Franklin S. T., M. C. Newman, K. E. Newman and K. I. Meek. 2005. "Immune Parameters of Dry Cows Fed Mannan Oligosaccharides and Subsequent Transfer of Immunity to Calves" *Journal Dairy Science*, 88: 766-775.
3. Grusenmeyer D., Ryan C., Overton T., 2005. Keep colostrum in mind when shortening dry periods. *The Manager*, Dec 2005, 24.
4. Hopkins F. M., D. F. Dean, W. Green. 1984. Failure of passive transfer in calves: comparison of field diagnosis methods. *Med Vet Pract.* 65(8): 625-628.
5. Hough R. L., F. D. McCarthy, H. D. Kent, D. E. Eversole and M. L. Wahlberg. 1990. "Influence of nutritional restriction during late gestation on production measures and passive immunity in beef cattle" *J. Anim. Sci.*, 68: 2622-2627.
6. Jardon, P. W., J. D. Robison, and J. Myake. 1999. Evaluation of specific gravity as a screening test for colostrum. *J.Dairy Sci.* 82 (Suppl. 1): 58 (Abstr.).
7. Jardon, P.W., Robinson, J.D., and Myake, J., 1999. Evaluation of specific gravity as a screening test for colostrum. *J.Dairy Sci.* 82 (Suppl. 1): 58 (Abstr.).
8. Nocek J. E., D. G. Braund and R. G. Warner . 1984 . "Influence of neonatal colostrum administration, immunoglobulin, and continued feeding of colostrum on calf gain, health, and serum protein" *Journal Dairy Science*, 67: 319-333.
9. Quarantelli A., F. Righi, M. Renzi, A. Bonomi, E. Nani, S. Taddei e S. Cavarani. 2004. "Vitamin E supplementation in dry period: effects on distribution of a-tocopherol in cows and calves plasma and on immunoglobulins synthesis" *Atti della Società Italiana di Buiatria*. Vol. XXXVI.
10. Quigley J. D. and J. J. Drewry. 1998. "Nutrient and Immunity Transfer from Cow to Calf Pre and Postcalving" *Journal Dairy Science*, 81: 2779-2790.
11. Quigley J. D., C. J. Kost and T. A: Wolfe. 2002. "Effects of Spray-Dried Animal Plasma in Milk Replacers or Additives Containing Serum and Oligosaccharides on Growth and Health of Calves" *Journal Dairy Science*, 85: 413-421.
12. Sikka P., D. Lall, U. Arora, R. K. Sethi. 2002. "Growth and passive immunity in response to micronutrient supplementation in new-born calves of Murrah buffaloes given fat soluble vitamins during late pregnancy" *Live-stock Production Science*, 75: 301-311.

CURVE DI CRESCITA DELLA POPOLAZIONE DI CAPRIOLI DELLA PROVINCIA DI MASSA-CARRARA¹

GROWTH CURVES IN ROE DEER POPULATION OF MASSA-CARRARA PROVINCE¹

Chiara Serena Soffiantini, Chiara Lazzini, Alberto Sabbioni, Alessio Zanon, Valentino Beretti

PAROLE CHIAVE:

capriolo, caccia di selezione, curve di crescita, Massa-Carrara.

KEY WORDS:

roe deer, selective hunting, growth curves, Massa-Carrara.

Riassunto

Lo scopo del lavoro è quello di descrivere il peso (totale ed eviscerato) e le modalità di accrescimento della popolazione di capriolo della provincia di Massa-Carrara tramite l'analisi della varianza e l'applicazione di un modello di crescita (equazione di Gompertz) ai dati raccolti dagli animali abbattuti durante la caccia di selezione in tre diversi Distretti (1, 2 e 3), fra il 1997 ed il 2005.

L'analisi della varianza ha evidenziato pesi (totali ed eviscerati) significativamente superiori nei maschi, considerando gli animali adulti. Il dimorfismo sessuale è invece attenuato alle età estreme: negli animali sotto ai due anni di età e in quelli oltre l'ottavo.

Anche i parametri ottenuti dall'equazione di Gompertz (peso alla maturità, velocità di crescita, età di massima crescita) hanno mostrato differenze significative in funzione del sesso e del distretto.

I 1014 animali del campione (469 maschi, 432 femmine e 113 di sesso indeterminato) hanno mostrato un peso totale medio alla maturità di $\text{kg } 23,459 \pm 0,114$ ed un peso eviscerato medio alla maturità di $\text{kg } 17,768 \pm 0,103$.

I pesi maggiori alla maturità, totali ed eviscerati, sono stati evidenziati nel distretto 2 (rispettivamente $\text{kg } 23,046$ e $17,407$).

Con riferimento al sesso, i maschi hanno mostrato maggior peso, totale ed eviscerato, alla maturità rispettivamente per il 13,67% e per il 15,40%.

Le femmine hanno messo in evidenza un accrescimento più rapido e una

¹Ricerche condotte con fondi FIL - Università di Parma. Il lavoro deve essere attribuito in parti uguali agli Autori.

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

Indirizzo per corrispondenza - Corresponding Author: Dott. Chiara Serena Soffiantini - Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti - Via del Taglio 8 - 43100 Parma - Tel: +39-521-032615 - e-mail: chiara.soffiantini@nemo.unipr.it

maggior precocità.

In conclusione la ricerca è stata in grado di descrivere la crescita come un processo continuo, prendendo in considerazione le diverse fonti di variazione. Se applicata sistematicamente alla popolazione presente in una certa area, questa procedura può rendere evidenti differenze in anni successivi, contribuendo alla gestione faunistica del capriolo.

Abstract

The aim of the study is to describe the weight (total and eviscerated) and the growth patterns of roe deer population in North Tuscany (Massa-Carrara Province) by ANOVA and through the application of a growth model (Gompertz equation) on the data collected from animals slaughtered during the selective hunting period in 3 different hunting districts (1, 2 and 3), between 1997 and 2005.

ANOVA evidenced significantly higher weights (total and eviscerated) in males, considering animals of adult age. Sexual dimorphism is minimized at extreme ages: in young animals before 2nd year and in old animals over 8th year.

Significant differences have also been found among districts and between sexes concerning growth parameters, obtained from Gompertz equation (maturity weight, growth rate, age of maximum growth).

The whole sample of 1014 animals (469 males, 432 females and 113 with undetermined sex) showed a mean value of maturity total weight of kg 23.459 ± 0.114 and a maturity eviscerated weight of kg 17.768 ± 0.103 .

The highest maturity weights, total and eviscerated, have been shown in district 2 (resp. kg 23.944 and kg 18.171) and the lowest maturity weights have been shown in district 1 (resp. kg 23.046 and kg 17.407).

With reference to sex, males showed a higher maturity weight, total and eviscerated, than females, by resp. 13.67% and al 15.40%.

Females grew faster than males and they were more precocious.

In conclusion the research was able to describe the growth as a continuous phenomenon, taking into account the different sources of variation. If applied periodically to the population reared on a certain area, this procedure will be able to explain differences among years, so contributing to a better management.

Introduzione

Nella distribuzione del capriolo in Italia sono attualmente individuabili due grandi subareali: il primo comprende tutto l'Arco Alpino, l'Appennino Ligure e Lombardo, sino alle province di Genova e Pavia, ed i rilievi delle province di Asti ed Alessandria; il secondo si estende lungo la dorsale appenninica dalle province di Parma e Massa-Carrara sino a quelle di Terni e Macerata ed occupa anche i rilievi delle province di Pisa, Siena, Grosseto e Viterbo nonché la Maremma toscana. Questi due subareali sono tra loro separati da uno iato spaziale, grosso modo compreso tra i fiumi Scrivia e Stirone, che sta tuttavia lentamente scomparendo (1).

Attualmente non è possibile stimare con precisione la consistenza globale della specie sul territorio nazionale, ma essa dovrebbe aggirarsi intorno ai 421.000 capi (2).

Lo straordinario patrimonio faunistico presente sulla nostra penisola costituisce una grande risorsa. Quando la presenza degli ungulati selvatici, però, supera i limiti di sostenibilità per le risorse ambientali (capacità portante) e quelli di accettabilità per l'impatto sulle attività umane (densità agro-silvo-pastorale), si pongono problemi di non facile risoluzione in relazione all'esigenza di gestire tale presenza.

Ciò è ulteriormente aggravato dall'esiguo numero, anche se in aumento, dei predatori naturali sul nostro territorio. I cosiddetti carnivori inseguitori, tra i quali il lupo, esercitano una selezione in particolare a carico di individui immaturi, malati o feriti e vecchi.

La principale difficoltà che l'uomo incontra nell'impegno della conservazione della fauna selvatica è quella di mantenere in equilibrio le innumerevoli componenti dell'ecosistema che si prefigge di gestire.

La caccia di selezione rappresenta un valido ausilio nello sforzo di conservare in modo armonico specie ad alta densità ambientale, come appunto il capriolo per la Provincia di Massa-Carrara.

Il prelievo venatorio di questo piccolo cervide viene programmato sulla base dei risultati dei censimenti, per evitare di depauperare la popolazione e di alterarne la struttura piramidale per classi di sesso e di età.

Il prelievo viene effettuato in modo quali-quantitativo, tenendo conto del numero d'individui prelevabile e della distribuzione nelle classi d'età e sesso riscontrata nella popolazione.

All'interno della provincia di Massa-Carrara è funzionante un unico Ambito Territoriale di Caccia (A.T.C. MS 13) che ha una superficie totale di 85.960 ha circa dei quali 67.652 ha cacciabili, quasi tutti localizzati in Lunigiana.

Il territorio risultato idoneo alla gestione faunistica del capriolo è suddiviso in tre "Distretti di Gestione". Questi rappresentano l'unità territoriale minima nella quale si realizzano tutte le operazioni finalizzate alla conservazione della specie, sulla base degli obiettivi indicati dal piano faunistico-venatorio provinciale.

Le operazioni di censimento e di monitoraggio sono organizzate annualmente dall'A.T.C. tramite i responsabili dei distretti, avvalendosi della collaborazione di tecnici faunistici qualificati.

Dopo la stesura del piano di prelievo, i capi da abbattere vengono nominalmente assegnati ai cacciatori di selezione, specificando il sesso e la classe di età dell'animale.

Gli obiettivi della ricerca sono la valutazione delle caratteristiche ponderali della popolazione di caprioli in provincia di Massa-Carrara e la definizione dell'andamento della crescita, mediante l'applicazione di opportuni modelli teorici, dei gruppi di animali presenti in distretti diversi.

Materiali e metodi

L'indagine è stata condotta analizzando le schede di controllo, compilate al

momento dell'abbattimento selettivo, di 1014 caprioli (469 maschi, 432 femmine e 113 animali a sesso non definito) negli anni dal 1997 al 2005 presso i tre distretti nei quali è suddiviso l'ATC MS13 della provincia di Massa-Carrara.

Il Distretto 1 comprende i comuni di Comano, di Fivizzano e parte del comune di Licciana Nardi; il Distretto 2 comprende i comuni di Filattiera, di Pontremoli e parte del comune di Bagnone; il Distretto 3 comprende una parte dei comuni di Licciana Nardi e di Bagnone.

Di ogni animale abbattuto sono stati registrati il sesso, la classe di età ed il distretto di abbattimento, nonché il peso totale ed eviscerato. L'età è stata stimata attraverso il controllo della tavola dentaria da personale abilitato ed espressa in mesi. Le classi di età considerate sono state 10, con intervalli di 12 mesi.

I dati relativi a peso totale ed eviscerato sono stati elaborati statisticamente con il package SAS (ver. 9.1.3, 2004), applicando l'analisi della varianza, secondo un modello lineare che prevedeva i fattori fissi del sesso (2 livelli), dell'anno di abbattimento (9 livelli), del distretto (3 livelli), dell'età (10 livelli), nonché le interazioni sesso*età e distretto*età.

Inoltre, attraverso l'applicazione della regressione non lineare, i dati sono stati adattati alla equazione di Gompertz (3), 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; b_0 è il peso (kg) alla maturità; b_1 è il tasso di crescita e b_2 è l'età (mesi) alla quale si raggiunge il tasso di crescita più elevato. Quando $t = b_2$, allora $P = b_0/e$, in cui e = base dei logaritmi naturali (2,7182818...). In tale momento è possibile ricavare l'entità del tasso di crescita massimo:

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

Le significatività delle differenze fra i parametri calcolati in relazione al distretto ed al sesso sono state testate con il "t" di Student (4).

Risultati e discussione

Gli animali provenienti dai distretti 1, 2 e 3 sono stati rispettivamente 486 (47,93%), 353 (34,81%) e 175 (17,26%); i maschi rappresentavano il 46,25% del campione, le femmine il 42,60%; di 113 soggetti (11,14%) non era specificato il sesso: nella elaborazione delle curve di crescita il loro contributo è stato quindi rimosso. Le classi di età maggiormente rappresentate sono state quella da 0 a 12 mesi (17,95%) e quella da 13 a 24 mesi (21,10%); in totale gli animali fino a 5 anni di età hanno rappresentato l'85,01% delle osservazioni. Va tuttavia specificato che l'attribuzione dell'età può portare, a volte, a false attribuzioni, soprattutto nella distinzione delle classi più avanzate.

Le tabelle 1 e 2 riportano le medie stimate dei pesi (totale e dopo eviscerazione) rilevati sui caprioli alle diverse classi di età, distinte per sesso e distretto di provenienza.

Tabella 1:

medie stimate ($\pm$ es) del peso vivo e del peso dopo eviscerazione dei caprioli in relazione alla classe di età ed al sesso.

Table 1:

LS-means ($\pm$ se) of total and eviscerated weight of roe deer as related to age class and gender.

Peso vivo (kg) - Live weight (kg)		
Sesso <i>Gender</i>	Femmine <i>Females</i>	Maschi <i>Males</i>
Classe di età <i>Class of age</i>		
1	12.14 $\pm$ 0.42	12.00 $\pm$ 0.40
2	19.97 $\pm$ 0.29	20.35 $\pm$ 0.21
3	21.53a $\pm$ 0.25	24.51b $\pm$ 0.30
4	22.00a $\pm$ 0.26	24.84b $\pm$ 0.26
5	22.85a $\pm$ 0.33	24.72b $\pm$ 0.31
6	22.27a $\pm$ 0.46	25.32b $\pm$ 0.40
7	20.67a $\pm$ 0.54	25.58b $\pm$ 0.55
8	22.30a $\pm$ 0.62	25.15b $\pm$ 0.85
9	21.10 $\pm$ 0.93	22.76 $\pm$ 1.16
10	23.84 $\pm$ 1.58	22.13 $\pm$ 1.48
Peso dopo eviscerazione (kg) - Eviscerated weight (kg)		
Sesso <i>Gender</i>	Femmine <i>Females</i>	Maschi <i>Males</i>
Classe di età <i>Class of age</i>		
1	8.86 $\pm$ 0.38	8.84 $\pm$ 0.36
2	15.05 $\pm$ 0.27	15.24 $\pm$ 0.19
3	16.17a $\pm$ 0.23	18.88b $\pm$ 0.27
4	16.48a $\pm$ 0.23	19.14b $\pm$ 0.24
5	17.35a $\pm$ 0.30	19.06b $\pm$ 0.29
6	16.55a $\pm$ 0.42	19.03b $\pm$ 0.37
7	15.50a $\pm$ 0.50	18.65b $\pm$ 0.51
8	16.86a $\pm$ 0.57	19.09b $\pm$ 0.78
9	15.80 $\pm$ 0.85	16.22 $\pm$ 1.07
10	17.61 $\pm$ 1.45	16.92 $\pm$ 1.36

Tabella 2:

medie stimate ($\pm$ es) del peso vivo e del peso dopo eviscerazione dei caprioli in relazione alla classe di età ed al distretto di provenienza.

Table 2:

LS-means ($\pm$ se) of live and eviscerated weight of roe deer related to age class and district of origin.

Peso vivo (kg) - Live weight (kg)			
Distretto <i>District of origin</i>	1	2	3
Classe di età <i>Class of age</i>			
1	11.76 $\pm$ 0.43	12.85 $\pm$ 0.53	11.60 $\pm$ 0.53
2	19.62a $\pm$ 0.22	20.82b $\pm$ 0.29	20.04ab $\pm$ 0.38
3	22.07a $\pm$ 0.27	23.68b $\pm$ 0.28	23.30b $\pm$ 0.45
4	22.73a $\pm$ 0.28	23.96b $\pm$ 0.28	23.57ab $\pm$ 0.40
5	23.85ab $\pm$ 0.29	24.45b $\pm$ 0.35	23.06a $\pm$ 0.56
6	23.22 $\pm$ 0.36	24.26 $\pm$ 0.55	23.90 $\pm$ 0.71
7	22.99 $\pm$ 0.52	23.74 $\pm$ 0.81	22.65 $\pm$ 0.73
8	23.29 $\pm$ 0.66	23.54 $\pm$ 0.81	24.36 $\pm$ 1.25
9	22.49 $\pm$ 0.74	22.50 $\pm$ 1.74	20.80 $\pm$ 1.61
10	23.43 $\pm$ 1.04	22.16 $\pm$ 2.50	23.37 $\pm$ 2.50
Peso dopo eviscerazione (kg) - Eviscerated weight (kg)			
Distretto <i>District of origin</i>	1	2	3
Classe di età <i>Class of age</i>			
1	8.80 $\pm$ 0.39	9.37 $\pm$ 0.49	8.37 $\pm$ 0.49
2	14.79a $\pm$ 0.20	15.63b $\pm$ 0.27	15.01ab $\pm$ 0.35
3	16.87a $\pm$ 0.25	18.21b $\pm$ 0.26	17.50ab $\pm$ 0.42
4	17.22a $\pm$ 0.26	18.14b $\pm$ 0.25	18.06ab $\pm$ 0.37
5	18.18 $\pm$ 0.27	18.46 $\pm$ 0.32	17.98 $\pm$ 0.51
6	17.43 $\pm$ 0.33	18.25 $\pm$ 0.50	17.68 $\pm$ 0.65
7	16.53 $\pm$ 0.48	17.96 $\pm$ 0.74	16.73 $\pm$ 0.66
8	17.56 $\pm$ 0.60	17.68 $\pm$ 0.74	18.69 $\pm$ 1.14
9	17.22 $\pm$ 0.67	16.67 $\pm$ 1.60	14.14 $\pm$ 1.47
10	18.08 $\pm$ 0.95	15.36 $\pm$ 2.29	18.35 $\pm$ 2.29

Con riferimento al sesso, le medie stimate del peso totale e del peso eviscerato si presentano significativamente maggiori ($P < 0,05$) nei maschi, rispetto alle femmine, dal 3° all'8° anno di vita. Tale differenza oscilla fra l'8,18% del 5° anno ed il 23,75% del 7° anno per il peso totale, e fra il 9,86% del 5° anno ed il 20,32 del 7° anno per il peso eviscerato. Le differenze di peso fra maschi e femmine nelle categorie estreme di età non sono risultate significative ($P > 0,05$).

Con riferimento al distretto di provenienza, i caprioli abbattuti nel distretto 1 sono risultati mediamente più leggeri, sia per il peso totale che per quello eviscerato, di quelli del distretto 2 ($P < 0,05$), nel periodo fra il 2° ed il 4° anno di età. Le differenze sono state del 5-7% per il peso totale e del 5-8% per il peso eviscerato. Nello stesso arco di tempo, i caprioli abbattuti nel distretto 3 hanno manifestato pesi intermedi rispetto a quelli dei distretti 1 e 2. Solo al 5° anno di età il peso totale dei caprioli del distretto 3 è risultato significativamente minore di quello registrato per gli animali del distretto 2 ($P < 0,05$) e, in modo non statisticamente significativo, del distretto 1. Le differenze di peso fra caprioli provenienti dai tre distretti in corrispondenza delle altre classi di età non sono mai risultate significative, anche se i soggetti del distretto 2 sono quasi sempre risultati più pesanti. Sabbioni *et al.* (5) hanno messo in evidenza un effetto significativo della zona di abbattimento sul peso totale e sulle misure somatiche di caprioli abbattuti in provincia di Parma.

I parametri dell'equazione di Gompertz, riferiti sia al peso totale sia a quello eviscerato in funzione dell'età, sono riportati nelle tabelle 3 e 4, rispettivamente. Essi hanno permesso di costruire le curve di crescita espresse nei grafici da 1 a 4.

L'accrescimento è un fenomeno fisiologico continuo che risente di fattori genetici ed ambientali; nel caso degli animali domestici in produzione zootecnica, questi ultimi vengono tenuti sotto controllo ed ottimizzati, così da garantire le massime performance agli animali. In un selvatico, l'effetto di tali fattori è probabilmente più marcato ed il fenomeno può assumere un andamento a gradini, in corrispondenza dei periodi di restrizione alimentare. Una curva di crescita, per definizione, ammortizza le asperità legate all'azione dei fattori ambientali, rappresentando l'accrescimento come un fenomeno continuo e regolare. Ciò ha un indubbio valore pratico perché i parametri che consentono di disegnare la curva sono caratterizzati da un loro errore standard, che permette di adottare dei limiti di confidenza 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, come precedentemente rilevato, il peso dell'animale alla maturità. Gli animali nel loro insieme hanno messo in luce un valore medio pari a $\text{kg } 23,459 \pm 0,114$ per il peso totale e $\text{kg } 17,768 \pm 0,103$ per quello eviscerato. La relazione fra peso totale e peso eviscerato è riportata nel grafico 5. Il suo esame permette di mettere in evidenza una forte linearità ($R^2=0,8646$) fra i due parametri, che non viene sostanzialmente modificata dall'introduzione di una regressione quadratica ($R^2=0,8711$). La resa in peso eviscerato sul

Tabella 3:
parametri delle curve di crescita dei caprioli in relazione al distretto e al sesso.
Table 3:
growth curves parameters of roe deer as related to district of origin and gender.

	n.	Peso alla maturità – <i>Maturity weight</i> (b0) kg ± e.s. <i>kg ± se</i>	Velocità di crescita – <i>Growth rate</i> (b1) ± e.s. ± <i>se</i>	Età alla massima crescita – <i>Age of maximum growth</i> (b2) mesi ± e.s. <i>months ± se</i>	ESR – <i>RSE</i>	R ²
Tutti - <i>All</i>	1014	23.459 ± 0.114	0.134 ± 0.005	2.814 ± 0.202	2.431	0.773
Distretto – <i>District of origin</i>						
1	486	23.046 ± 0.167	0.132 ± 0.007	2.953 ± 0.291	2.455	0.774
2	353	23.944 ± 0.165	0.141 ± 0.009	2.725 ± 0.293	2.090	0.818
3	175	23.608 ± 0.319	0.127 ± 0.014	2.608 ± 0.587	2.770	0.724
Sesso – <i>Gender</i>						
Femmine – <i>Females</i>	432	22.031 ± 0.139	0.151 ± 0.011	2.448 ± 0.458	2.186	0.608
Maschi – <i>Males</i>	469	25.042 ± 0.163	0.120 ± 0.006	3.331 ± 0.425	2.305	0.717
Distretto – <i>District of origin</i>						
1	211	21.629 ± 0.215	0.143 ± 0.016	2.272 ± 0.825	2.312	0.536
	219	24.680 ± 0.234	0.114 ± 0.008	2.881 ± 0.648	2.285	0.725
2	151	22.592 ± 0.176	0.176 ± 0.021	2.972 ± 0.644	1.770	0.638
	158	25.610 ± 0.242	0.123 ± 0.009	3.359 ± 0.645	1.909	0.770
3	70	21.876 ± 0.372	0.151 ± 0.030	2.257 ± 0.847	2.307	0.732
	92	25.003 ± 0.440	0.122 ± 0.016	3.545 ± 1.033	2.796	0.665

Tabella 4:
parametri delle curve di crescita del peso eviscerato dei caprioli in relazione al distretto e al sesso.
Table 4:
growth curves parameters of eviscerated weight of roe deer as related to district of origin and gender.

		Peso eviscerato alla maturità – <i>Maturity eviscerated weight</i>	Velocità di crescita – <i>Growth rate</i>	Età alla massima crescita – <i>Age of maximum growth</i>	ESR – <i>RSE</i>	R ²
		n.	(b0) kg ± e.s. kg ± se	(b1) ± e.s. ± se	(b2) mesi ± e.s. months ± se	
Tutti - All		1014	17.768 ± 0.103	0.138 ± 0.006	3.443 ± 0.217	2.201 0.726
Distretto – <i>District of origin</i>						
1		486	17.407 ± 0.146	0.138 ± 0.009	3.497 ± 0.309	2.182 0.730
2		353	18.171 ± 0.162	0.145 ± 0.011	3.410 ± 0.335	2.066 0.750
3		175	17.930 ± 0.276	0.126 ± 0.014	3.386 ± 0.607	2.380 0.700
Sesso – Gender						
Femmine – Females		432	16.554 ± 0.119	0.160 ± 0.014	3.003 ± 0.474	1.919 0.553
Maschi – Males		469	19.104 ± 0.155	0.121 ± 0.007	3.858 ± 0.492	2.198 0.639
Distretto – <i>District of origin</i>						
1	Sesso – Gender F	211	16.292 ± 0.186	0.148 ± 0.019	2.798 ± 0.868	2.024 0.481
	M	219	18.701 ± 0.219	0.116 ± 0.010	3.129 ± 0.771	2.147 0.637
2	F	151	16.874 ± 0.148	0.219 ± 0.031	3.881 ± 0.562	1.579 0.580
	M	158	19.741 ± 0.263	0.124 ± 0.012	4.443 ± 0.802	2.080 0.665
3	F	70	16.577 ± 0.351	0.137 ± 0.029	2.531 ± 1.014	2.076 0.678
	M	92	19.037 ± 0.375	0.124 ± 0.017	4.355 ± 1.064	2.383 0.642

Grafico 1:
curve di crescita del peso pieno dei caprioli in relazione al distretto.
Figure 1:
growth curves of roe deer weight as related to hunting district.

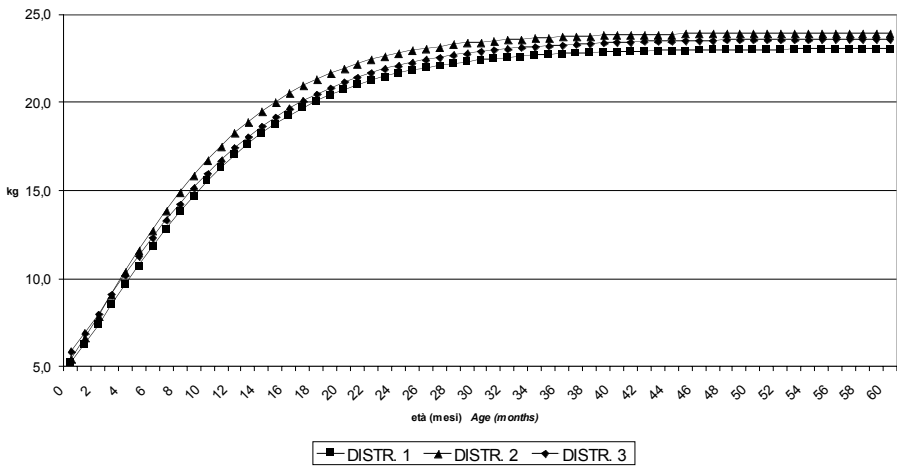


Grafico 2:
curve di crescita del peso pieno dei caprioli in relazione al sesso.
Figure 2:
growth curves of roe deer weight as related to gender.

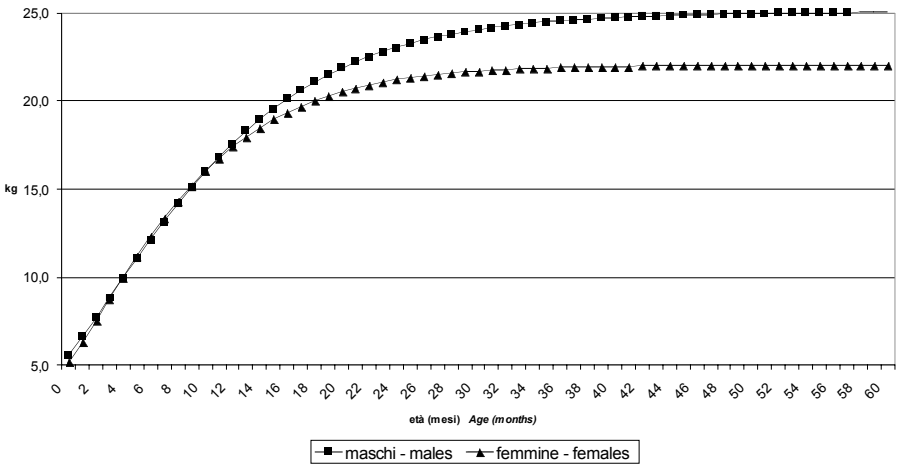


Grafico 3:

curve di crescita del peso eviscerato dei caprioli in relazione al distretto.

Figure 3:

growth curves of eviscerated weight of roe deer as related to hunting district.

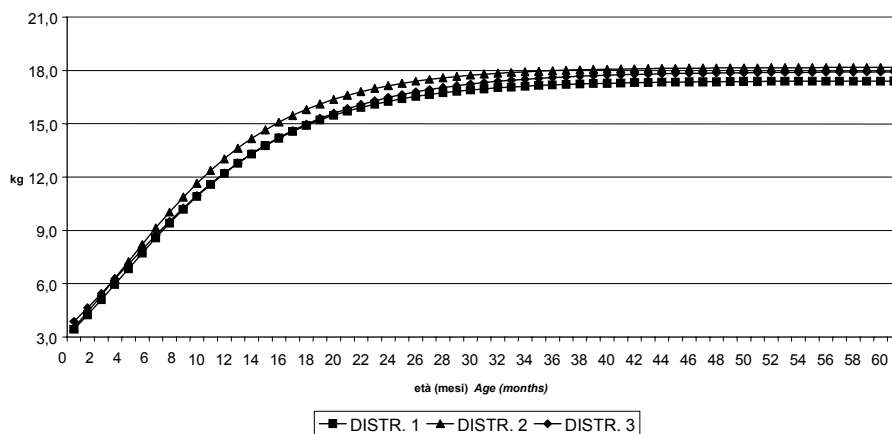


Grafico 4:

curve di crescita del peso eviscerato dei caprioli in relazione al sesso.

Figure 4:

growth curves of eviscerated weight of roe deer as related to gender.

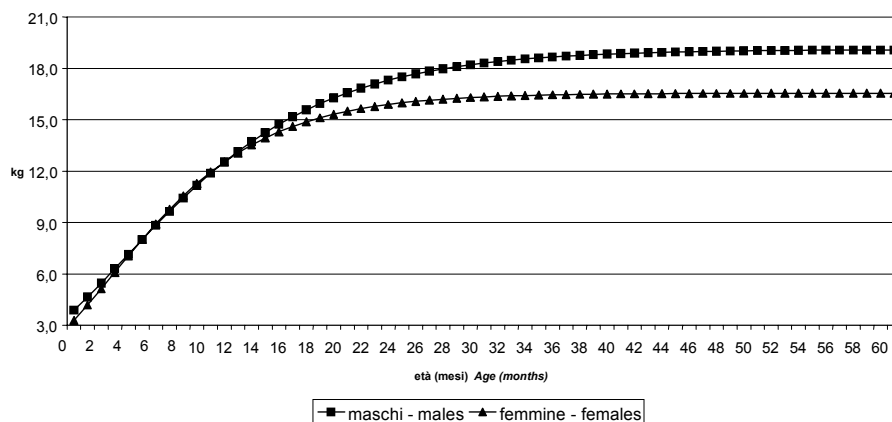
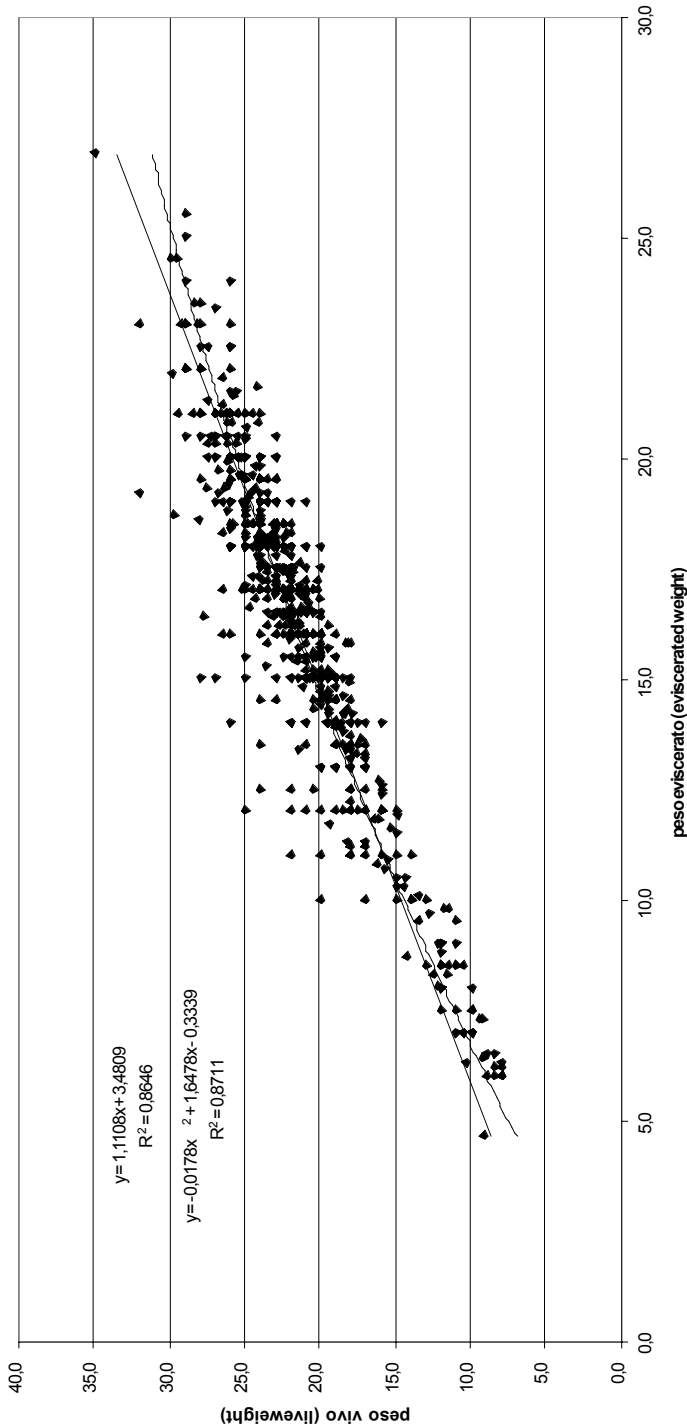


Grafico 5:
relazione fra peso eviscerato e peso vivo.
Figure 5:
relationship between live and eviscerated weight.



peso totale, in un animale maturo, è risultata pari quindi al 75,74%, valore che risulta inferiore a quello empiricamente adottato da alcuni ATC, pari al 78% e a quello riscontrato nei caprioli della provincia di Parma da Sabbioni et al. (5) pari al 78,76%.

Il distretto di provenienza dei caprioli si è dimostrato un fattore di variazione significativo, con riferimento ai parametri dell'equazione di Gompertz sia per il peso totale che per quello dopo eviscerazione. I soggetti più pesanti alla maturità sono risultati quelli del distretto 2 (risp. kg 23,944 e kg 18,171) ed i più leggeri quelli del distretto 1 (risp. kg 23,046 e kg 17,407). Il dato conferma quanto più sopra riportato in relazione all'analisi dei pesi alle diverse età. I caprioli del distretto 2 hanno anche manifestato una maggior velocità di crescita ed una maggior precocità rispetto a quelli del distretto 1. I soggetti del distretto 3 sono risultati intermedi per il peso alla maturità, manifestando una velocità di crescita minore ed una maggiore precocità: ne consegue che, se il loro sviluppo risulta precoce, il loro accrescimento è invece rallentato.

Con riferimento al sesso e a conferma di quanto riportato in letteratura (6, 7), i maschi hanno presentato un peso alla maturità, sia totale che eviscerato, superiore rispetto a quello delle femmine rispettivamente per il 13,67% e per il 15,40%. I maschi hanno sempre manifestato una minor velocità di crescita e una minore precocità.

Anche all'interno di ciascun distretto è stato possibile riscontrare un effetto del sesso sul peso, totale ed eviscerato, alla maturità, sulla velocità di crescita e sulla precocità.

Come è possibile rilevare dall'esame delle tabelle 3 e 4 e alla luce dei pochi riferimenti bibliografici in argomento (5), esiste una diversa precocità del peso totale e del peso eviscerato (rispettivamente 2,814 mesi contro 3,443): l'età di massima crescita del corpo intero dell'animale è individuabile quindi circa 19 giorni prima di quella della sola carcassa. Sembra quindi che nel capriolo, come anche in altre specie animali, la precocità di sviluppo degli organi interni sia più veloce rispetto a quella del resto del corpo.

Nel caso delle differenze fra i sessi, le femmine hanno manifestato la massima crescita del peso totale, pari a 41 g/d, a 73 giorni di vita, in corrispondenza di un peso totale di kg 8.1. I maschi, invece, hanno evidenziato il massimo incremento ponderale, pari a 37 g/d, a 100 giorni di vita e ad un peso di kg 9.2. Differenze analoghe sono state riscontrate a carico del peso eviscerato (risp. 33 g/d a 90 d e 6,1 kg nelle femmine; 28 g/d a 115 d e 7,0 kg nei maschi).

Anche all'interno di ciascun distretto le femmine si sono sempre dimostrate più precoci dei maschi. Il riscontro di una maggiore precocità nelle femmine è normale ed ampiamente descritto in letteratura nelle specie di interesse zootecnico (7).

Le differenze fra distretti sono risultate invece modeste e probabilmente legate a fattori di tipo ambientale. Nei tre distretti presi in considerazione, l'età alla massima crescita è risultata pari a 89, 82 e 78 giorni ed ha comportato un accrescimento giornaliero massimo di 37, 41 e 37 g/d in corrispondenza di un peso totale di 8,5, 8,8 e 8,7 kg, rispettivamente per i distretti 1, 2 e 3.

Il massimo incremento giornaliero del peso eviscerato nei tre distretti è risultato pari, rispettivamente, a 30, 32 e 28 g/d, raggiunti ad un peso eviscerato di 6,4,

6,7 e 6,6 kg e ad un'età di 105, 102 e 102 giorni.

Dall'analisi dei dati esposti sembra possibile mettere in rilievo modeste differenze fra i tre distretti e differenze molto più marcate fra i sessi, anche all'interno di ciascun distretto, sia per il peso totale che per quello eviscerato.

La tabella 5 mette in luce le diverse tipologie vegetazionali dei tre distretti, calcolate con il Corine Land Cover (<http://image2000.jrc.it/clc/index.cfm>), sistema satellitare operante in ambito UE, in grado di registrare le differenze nel tempo della copertura del suolo, attraverso un sistema computerizzato di analisi di immagine. Le differenze fra i tre distretti non sono risultate particolarmente forti: la copertura boschiva, nel totale, va dal 79% del distretto 1 al 82% del distretto 3, le aree coltivate o a pascolo vanno dal 16% del distretto 3 al 20 % del distretto 1. Tuttavia l'analisi della tabella dovrebbe essere integrata da considerazioni di tipo personale, legate alla conoscenza dei luoghi e delle loro caratteristiche. Infatti, il distretto 2, pur mettendo in luce sulla carta una copertura vegetazionale intermedia fra gli altri due distretti, in realtà subisce maggiormente, in senso positivo, l'intervento dell'uomo, con sfalci in zone aperte, coltivazioni e tagli dei boschi che generano radure più o meno ampie, particolarmente gradite al capriolo. Oltre a ciò riveste particolare importanza la maggiore dolcezza dei pendii e l'altezza alla quale si trovano le aree sopra citate. Nello stesso distretto 2 esse sono localizzate a quote inferiori. Le zone molto aperte dei distretti 1 e 3 si trovano sulla sommità dei monti; nei periodi caldi presentano una vegetazione secca e in quelli freddi sono più soggetti alle intemperie. Da non sottovalutare, poi, nel distretto 2 la quasi totale assenza di agglomerati urbani.

Con riferimento al confronto con altre zone geograficamente vicine alla provincia di Massa-Carrara, Sabbioni *et al.* (5) riportano i dati dei caprioli abbattuti in provincia di Parma, nell'ambito degli ATC PR 4, 5 e 8. In queste zone gli animali sono risultati più pesanti (+7,5% per il peso totale e +11,8% per quello eviscerato) e più precoci (-16 d di età alla massima crescita), rispetto a quelli della provincia di Massa-Carrara. Le differenze nel peso totale si ipotizza siano dovute a fattori genetici (diverse sottopopolazioni) ed ambientali (caratteristiche del territorio, altitudine media, competizione con altre specie, selvatiche e non, presenza nel comprensorio di attività agricole, livello di antropizzazione, densità della popolazione). In assenza di dati di confronto con altre realtà territoriali, che potrebbero spiegare le risultanze ottenute, riteniamo tuttavia utile per il momento registrare tali differenze.

Conclusioni

I risultati ottenuti contribuiscono ad una migliore conoscenza della popolazione di caprioli della provincia di Massa-Carrara, mettendo in evidenza alcune differenze nell'accrescimento degli animali, legate al sesso e alla zona in cui sono vissuti. Uno degli aspetti qualificanti dell'indagine è risultata essere la trasposizione dei dati, desunti dalle schede di controllo, in grafici rappresentanti le curve di crescita, cioè il passaggio da una modalità di descrizione statica dell'animale ad una dinamica, che "smussa" gli effetti di tipo discreto operati dai vari fattori sull'accrescimento. La regolare applicazione della metodica di analisi sulla popolazione che è presente in un determinato comprensorio, è in grado poi di rendere evidenti differenze fra i diversi

Tabella 5:

ripartizione delle tipologie vegetazionali nei tre distretti dell'ATC MS13.

Table 5:

allocation of plant typologies in three hunting districts in Massa-Carrara province.

Distretto <i>District</i>		1	2	3
Tessuto urbano discontinuo <i>Urban discontinuous tissue</i>	%	0	0	0
Oliveti <i>Olive tree grove</i>	%	1	0	1
Prati stabili <i>Permanent meadows</i>	%	3	1	1
Colture annuali associate a colture permanenti <i>Herbages associated to permanent cultures</i>	%	1	0	0
Sistemi colturali e particellari complessi <i>Complex cultural and particle systems</i>	%	4	1	1
Colture agrarie e spazi naturali importanti <i>Cultures and important natural spaces</i>	%	9	12	13
Boschi di latifoglie <i>Broad-leaved woods</i>	%	68	76	79
Boschi di conifere <i>Conifer woods</i>	%	1	0	0
Boschi misti <i>Mixed woods</i>	%	3	1	1
Aree a pascolo naturale <i>Natural pastures</i>	%	3	3	1
Brughiere o cespugliati <i>Moors or bushes</i>	%	0	2	1
Vegetazione boschiva ed arbustiva in evoluzione <i>Developing woods or shrubs</i>	%	7	4	2
Totale <i>Total</i>	%	100	100	100

anni, fornendo ulteriori dati utili alla gestione degli animali.

Inoltre, riteniamo che il lavoro possa offrire altri utili spunti nei riguardi della gestione di questo ungulato. Ci riferiamo alla valutazione della presenza del capriolo e delle sue caratteristiche di accrescimento in distretti caratterizzati dalla presenza di ambienti non molto diversificati dal punto di vista vegetazionale, ma da una diversa antropizzazione e da un diverso utilizzo del suolo agricolo; in tale contesto il piccolo cervide va considerato non più solo realtà di presenza ma soggetto da valorizzare come una risorsa economica importante, con la conseguente necessità di una gestione specifica. In questa fase l'ATC ha un ruolo fondamentale poiché con la sua presenza continua e costante sull'intero territorio di competenza, è in grado di monitorare realmente questo patrimonio animale.

Sarebbe utile in futuro che i dati rilevati al momento dell'abbattimento non fossero limitati al peso, ma ampliati con il rilievo di misure biometriche. In tal modo si avrebbero ulteriori informazioni utili alla conoscenza della popolazione in esame.

Sarebbe inoltre auspicabile che indagini come quella qui riportata venissero effettuate in altre province oggetto di piani di abbattimento selettivo, al fine di estendere la conoscenza alle diverse popolazioni e per mettere in evidenza differenze morfologiche fra le stesse.

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 caccia e delle opinioni personali, va riconosciuto in questo caso alla gestione connessa con la caccia di selezione un ruolo importante nell'acquisizione di un bagaglio di nozioni utili per una migliore conoscenza del capriolo.

Bibliografia

1. Toso S., Pedrotti L., Duprè E., Preatoni D. (2003) Banca dati ungulati. Habitat, Rivista di gestione faunistica, p. 40-47.
2. I.N.F.S., (2006) _ Comunicazione personale.
3. Emmans G.C. (1989) The growth of turkeys. In "Recent advances in turkey science", Nixey C. and Grey T.C. Ed., Butterworths.
4. Pilla A.M. (1985) Metodologia statistica e programmazione degli esperimenti. Ed. Missio, Udine.
5. Sabbioni A., Soffiantini C.S., Pisani G., Beretti V., Sussi C., Superchi P. (2002) Misurazioni somatiche e curve di crescita nella popolazione di caprioli (*Capreolus capreolus* c.) dell'Appennino parmense. Annali Fac. Med. Vet. di Parma, 22, 135-153.
6. Ford J.J. e 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.
7. Parigi-Bini R., Someda de Marco A. (1989) Zootecnica Speciale dei Bovini. Produzione della carne. Patron Editore, Bologna.

RILIEVI BIOMETRICI SU PULEDRI DI RAZZA PUROSANGUE INGLESE E TROTTATORE ITALIANO

Franca Vaccari Simonini, Antonio Lucio Catalano,
Francesca Martuzzi, Valentino Beretti, Stefano Filippini

PAROLE CHIAVE:

cavallo, puledri, crescita, sviluppo, misure.

KEY WORDS:

horse, foals, growth, development, measurements.

Summary

A preliminary survey was carried out in stud farms of Thoroughbred (PSI) and Italian Trotters in the Emilia Romagna region, with the aim to investigate the muscle and bone development of foals throughout the first 18 months of age. The following measures were taken: wither height; hip height; body length; hearth girth; cannon bone girth; body weight. 45 PSI (24 colts and 21 fillies) and 77 Trotters (41 colts and 36 fillies) were measured. Body weights and withers heights in the first month of life of PSI are lower than those found in an American study about PSI foals bred in Kentucky, but similar to those found in another study regarding PSI bred in Florida. Until 18 months of age, no significant difference was found between colts and fillies of the same breed regarding withers height and hearth girth. Trotters are taller than PSI in the first month of life and during the period from 6 to 12 months of age. In the first month of life Trotters show also a wider hearth girth.

Riassunto

Questo lavoro rappresenta un'indagine preliminare in alcuni allevamenti di cavalli di razza Purosangue Inglese e Trottatore Italiano, siti in Emilia Romagna, relativamente al rilievo delle seguenti misurazioni biometriche, necessarie per poter valutare lo sviluppo muscolare e scheletrico dei puledri durante i primi 18 mesi di età: altezza al garrese; altezza della groppa; lunghezza del tronco; circonferenza del torace; circonferenza dello stinco; peso. Sono stati misurati 45 soggetti di razza PSI (24 maschi e 21 femmine) e 77 di razza Trottatore Italiano (41 maschi e 36 femmine).

I pesi e le altezze al garrese rilevati nel primo mese di vita dei Purosangue Inglese (PSI) risultano inferiori rispetto a quelli rilevati in uno studio americano riguardo a puledri PSI allevati nel Kentucky e simili a quelli rilevati in puledri allevati in Florida. Considerando l'altezza al garrese e la circonferenza toracica, non risultano differenze significative nell'ambito della stessa razza fra i maschi e le femmine, fino all'età di 18 mesi. Riguardo alle differenze fra le due razze, i Trottatori maschi e femmine risultano significativamente più alti dei Purosangue nel primo mese di vita, così

come nel periodo da 6 mesi ad un anno di età. I Trottatori hanno anche una maggiore circonferenza toracica rispetto ai PSI nel primo mese di vita.

Introduzione

Il Purosangue Inglese (PSI) ed il Trottatore Italiano sono le due razze equine da corsa allevate in Italia. Questi cavalli vengono selezionati ed allevati con la precisa finalità di creare animali atleti, che da adulti possano effettuare le migliori prestazioni possibili durante le competizioni. I puledri appartenenti a razze da corsa, crescendo molto velocemente, vanno spesso incontro a patologie dello sviluppo. Per questo motivo è importante monitorare costantemente la loro crescita.

La rilevazione periodica delle misurazioni biometriche è fondamentale per valutare il corretto accrescimento del puledro nel tempo e di conseguenza per prevedere il “tipo” e la conformazione che avrà il soggetto da adulto.

Questi sono dati importanti ai fini della selezione dei cavalli destinati alle corse, e per poter prevenire l’insorgenza di patologie ortopediche dello sviluppo (3). Il presente studio rappresenta una nota preliminare su rilevazioni biometriche effettuate in puledri PSI e Trottatore allevati in Emilia Romagna, con lo scopo di proseguire il lavoro con l’elaborazione delle curve di crescita e con la valutazione delle variabili che possono influire sull’andamento delle stesse.

Materiali e metodi

Sono stati misurati 45 soggetti di razza PSI (24 maschi e 21 femmine) e 77 di razza Trottatore Italiano (41 maschi e 36 femmine).

Il management coincideva nei diversi allevamenti che abbiamo seguito, prevedendo lo svezzamento dei puledri a 6 mesi di età, condizioni di stabulazione in relazione alla stagione ed alla temperatura, programmi sanitari.

I rilievi sono stati effettuati alla nascita e ripetuti ogni mese per i primi tre mesi; successivamente le misure sono state rilevate ogni tre mesi, fino al termine della permanenza in allevamento, o allo scadere dell’anno di età. Complessivamente, le misure sono state raccolte in un periodo che va dal primo giorno di vita al diciottesimo mese di età.

I dati sono stati suddivisi per classi di età del puledro, nel seguente modo:

classe 1: dal giorno 1 al giorno 30 dalla nascita; classe 2: dal giorno 31 al giorno 60; classe 3: dal giorno 61 al giorno 90; classe 4: dal giorno 91 al giorno 120; classe 5: dal giorno 121 al giorno 150; classe 6: dal giorno 151 al giorno 180; classe 7: dal giorno 181 al giorno 365; classe 8: dal giorno 366 al giorno 450; la classe 9: dal giorno 451 al giorno 540.

Per la raccolta dei dati biometrici, sono stati utilizzati un ippometro ed un metro zootecnico.

L’ippometro è stato utilizzato per le seguenti misurazioni:

- altezza al garrese, misurata dalla sommità della regione del garrese a terra;
- altezza alla groppa, misurata dal punto più alto della suddetta regione a terra;

- lunghezza del tronco, misurata dalla punta della spalla alla punta della natica (1).

Il metro zootecnico è stato utilizzato per la rilevazione di:

- circonferenza del torace, misurata dietro il margine posteriore della spalla;
- circonferenza dello stinco anteriore, misurata tra il terzo superiore ed il terzo medio della regione dello stinco (1).

I dati sono stati correlati alla rilevazione del peso vivo dei soggetti, quando presente la bilancia in allevamento.

I dati sono stati elaborati mediante l'utilizzo del Programma statistico SAS, procedura GLM (6).

Si è applicato il seguente modello:

$$y_{ijklmn} = \mu + A(R)_{ij} + R_j + N_k + M_l + S_m + E_n + \varepsilon_{ijklmn}$$

Dove:

y_{ijklmn} : valori osservati; μ : media generale; A: effetto fisso allevamento; R: razza; N: anno di nascita; M: mese di nascita; S: sesso; E: classe di età; ε : errore residuo. L'allevamento è stato gerarchicamente sottoposto alla razza in quanto i cavalli PSI appartengono ad un unico allevamento e i trottatori agli altri tre.

Risultati e discussione

Nella tab. n° 1 sono riportate le medie aritmetiche delle principali misurazioni somatiche dei puledri P.S.I. e Trottatori rilevate nella prima e nella nona classe di età, che riveste un certo interesse, in quanto a quest'età (18 mesi) i puledri PSI vengono condotti alle aste.

I pesi e le altezze al garrese rilevati nel primo mese di vita del puledro risultano inferiori rispetto a quelli riportati da Pagan *et al.* (4), riguardo a Purosangue Inglese allevati nel Kentucky: ad esempio nel nostro studio il peso medio dei soggetti (maschi e femmine insieme) della prima classe di età risulta di 54.38 ± 8.18 kg: tale peso risulta inferiore a quello rilevato alla nascita (55.12 ± 1.02 kg femmine; 57.24 ± 1.04 kg maschi) nello studio americano, mentre sono simili a quelli riportati da Kavazis (7) riguardo a PSI allevati in Florida: il peso alla nascita (maschi e femmine insieme) rilevato in questo studio era di 53.55 ± 5.2 kg. Nella tab. n° 2 sono riportate le medie ponderate delle misurazioni dell'altezza al garrese per classi di età, sesso e razza: non risultano differenze significative all'interno della stessa razza fra i maschi e le femmine, fino all'età considerata, né per PSI né per i Trottatori, in accordo a quanto riportato da Martin-Rosset (5), secondo il quale il dimorfismo sessuale nel cavallo inizia a manifestarsi dopo il 18° mese di età, mentre Pagan *et al.*, (4) riguardo ai PSI, rilevano che i maschi sono sempre significativamente più alti delle femmine in tutte le classi di età, dalla nascita fino a 150 giorni.

Riguardo alle differenze fra le due razze, dalla tab. n° 2 si può notare che i Trottatori maschi e femmine risultano significativamente più alti dei Purosangue nel primo mese di vita, così come nella 7° classe di età. I Trottatori hanno anche una maggiore circonferenza toracica rispetto ai PSI nel primo mese di vita (Tab. n°

3), mentre non sono state rilevate differenze fra i sessi all'interno della stessa razza nemmeno per questa misura.

Nei grafici dal n° 1 al n° 4 sono riportati gli andamenti delle misurazioni nel corso dell'intervallo di età dalla nascita ai 650 giorni di età (22 mesi) relativamente ai PSI, mentre nei grafici dal n° 5 al n° 8 sono riportate le misurazioni dei Trottatori dalla nascita ai 600 giorni di età (20 mesi). Per ambedue le razze si può notare un rapido incremento di tutte le misure lineari nei primi 180 giorni (6 mesi) di vita, mentre si osserva un rallentamento nel periodo successivo, forse dovuto allo stress dello svezzamento. Il peso invece manifesta un incremento costante. Tali grafici rappresentano tuttavia una rappresentazione sommaria dell'andamento del fenomeno della crescita, che dovrà essere in seguito osservato con il calcolo delle curve di crescita su un maggior numero di soggetti.

Conclusioni

Le misurazioni raccolte hanno confermato quanto rilevato in altri studi riguardo al manifestarsi del dimorfismo sessuale nel cavallo, che avverrebbe dopo i 18 mesi d'età, non essendo state rilevate differenze significative tra maschi e femmine nell'ambito delle due razze considerate. I Trottatori, rispetto ai PSI, risultano di taglia maggiore, anche se con differenze diverse nelle varie classi di età.

I pesi e le altezze al garrese rilevati nel primo mese di vita dei Purosangue Inglese risultano inferiori rispetto a quelli rilevati in uno studio americano riguardo a puledri PSI allevati nel Kentucky, nei quali si rilevava un significativo dimorfismo sessuale già a partire dal diverso peso alla nascita, superiore nei maschi rispetto alle femmine, mentre tali rilievi sono simili a quelli riportati in un altro studio riguardo PSI allevati in Florida.

L'analisi delle misure biometriche sul puledro ci permette di monitorare la sua crescita, e di poter di conseguenza intervenire ove si riscontrassero anomalie di sviluppo.

In questo studio sono presenti i primi strumenti per valutare l'accrescimento di soggetti di razza P.S.I. e Trottatore Italiano, in modo da indirizzare la selezione e la gestione dell'allevamento verso le migliori scelte possibili.

Bibliografia

1. Catalano A.L. (1993) Valutazione morfo-funzionale del cavallo. Igiene ed etnologia. Edizioni SBM.
2. Crepaldi P., Fornarelli F., Tamiozzo Calligarich A. (2005) Curve di crescita dei purosangue inglesi allevati in Italia: 13 anni di rilievi biometrici. Atti XVI Congresso ASPA, 440.
3. Crepaldi P., Tamiozzo Calligarich A., Cardone G., Brunazzi S., Cicogna M. (2005) Percentiles: A simple tool to monitor the growth of Thoroughbreds. In: The growing horse: nutrition and prevention of growth disorders. EAAP publication n°114, 69-71.
4. Pagan J.D., Brown-Douglas C.G., Caddell S. (2006) Body weight and condi-

tion of Kentucky Thoroughbred mares and their foals as influenced by month of foaling, season and gender. In: Nutrition and feeding of the broodmare. EAAP publication n°120, 245-252.

5. Martin - Rosset W. (1983) Revue bibliographique: Particularités de la croissance et du développement du cheval. Annales de Zootechnie, 32, 109-130.
6. SAS/STAT User's Guide ver. 9.1.3, SAS Institute Inc. Cary, NY, USA
7. Kavazis A.N. (2003) Growth rates in Thoroughbred Horses raised in Florida. Journal of Equine Veterinary Science, 23, 8, 353-357

	1° classe di età (1-30 giorni)					
	h. garrese ± ds	h. groppa ± ds	lung. tronco. ± ds	circ. torace ± ds	circ. stinco ant. ± ds	peso ± ds
P.S.I.	102.69±4.55	105.60±4.78	81.60±6.77	81.21±9.78	12.22±0.75	54.38±8.18
Trott.It.	102.78±4.64	106.09±5.10	83.90±6.55	90.87±6.45	12.36±0.72	74.30±17.11
	9° classe di età (450 - 540 giorni)					
	h. garrese ± ds	h. groppa ± ds	lung. tronco ± ds	circ. torace ± ds	circ. stinco ant. ± ds	peso ± ds
P.S.I.	147.83±3.60	149.96±3.51	146.83±5.05	165.80±5.75	18.60±0.92	405.00±7.25
Trott.It.	151.00±2.28	152.75±8.13	153.87±3.26	164.50±0.7	19.25±0.35	420.80±29.84

Tabella 1: medie aritmetiche delle principali misurazioni somatiche di puledri P.S.I. e Trottatori rilevate nella prima e nella nona classe di età (maschi e femmine insieme).

	PSI			Trottatore				
Classi di età	maschi	femmine	maschi vs femmine	maschi	femmine	maschi vs femmine	maschi PSI vs maschi trottatore	femmine PSI vs femmine trottatore
1	103.80	101.49	NS	105.09	104.54	NS	*	*
2	109.38	108.37	NS	112.13	111.31	NS	NS	NS
3	113.69	111.69	NS	120.54	117.03	NS	*	NS
4	124.34	127.34	NS	127.82	125.38	NS	NS	NS
5	128.13	131.52	NS	-	132.53	-	-	NS
6	130.03	128.80	NS	133.88	133.81	NS	0.06	*
7	135.20	133.58	NS	137.87	136.80	NS	*	**
8	142.62	141.02	NS	144.94	144.57	NS	0.19	0.07
9	147.50	144.18	NS	147.40	148.02	NS	NS	*

*, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.001$

Tabella 2: altezze al garrese per classi di età: medie ponderate

Classi di età	PSI			Trottatore				
	maschi	femmine	maschi vs femmine	maschi	femmine	maschi vs femmine	maschi PSI vs maschi trottatore	femmine PSI vs femmine trottatore
1	81.49	78.84	NS	93.09	89.99	NS	**	**
2	96.61	92.16	NS	100.29	102.08	NS	NS	*
3	102.98	105.34	NS	112.31	111.36	NS	*	NS
4	115.69	120.69	NS	122.27	114.33	NS	NS	NS
5	127.15	131.89	NS	-	148.71	-	-	NS
6	130.37	131.99	NS	139.89	138.97	NS	*	NS
7	145.37	145.06	NS	146.70	144.19	NS	NS	NS
8	156.86	155.98	NS	154.32	-	-	NS	-
9	165.76	161.23	NS	-	163.26	-	-	NS

*: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.001$

Tabella 3: circonferenze del torace per classi di età: medie ponderate

LE PATOLOGIE OCULARI DEL BOXER: STUDIO RETROSPETTIVO

Michela Bacchini, Barbara Simonazzi

PAROLE CHIAVE:

cane, occhio, Boxer, erosione corneale recidivante.

KEY WORDS:

dog, eye, Boxer, persistent corneal erosion.

MOTS CLÉS:

chien, oeil, Boxer, érosion récurrent de la cornée.

Riassunto

In questo studio vengono presi in considerazione 122 cani di razza Boxer sottoposti a visita specialistica per un problema oculare. Vengono esaminati 82 maschi e 40 femmine, l'età media è di 4,9 anni con un minimo di 1 mese ed un massimo di 12 anni. La patologia è bilaterale in 43 casi. Complessivamente sono state diagnosticate le seguenti patologie oculari: distichiasi (13 casi), ectropion (9 casi), entropion (5 casi), ciglia ectopiche (5 casi), papilloma palpebrale (3 casi), adenoma palpebrale (2 casi), lacerazione palpebrale (2 casi), mastocitoma palpebrale (un caso), emangioma congiuntivale (3 casi), micropunto lacrimale (4 casi), atresia dei punti lacrimali (3 casi), congiuntivite follicolare (18 casi), prollasso della ghiandola della terza palpebra (8 casi), erosione corneale recidivante (54 casi), distrofia corneale (6 casi), ferita corneale penetrante (4 casi), ulcera neurotrofica (un caso), perforazione corneale (un caso), leucoma cicatriziale (un caso), ustione chimica (un caso), corpo estraneo corneale (un caso), KCS (un caso), PPM (5 casi), atrofia dell'iride (4 casi), sospetto melanoma irideo (3 casi), cisti iridea (un caso), prollasso dell'iride (un caso), glaucoma (2 casi), cataratta (9 casi), PHA (2 casi), PHPV (un caso), neurite ottica (un caso), SARD (un caso), sindrome di Horner (2 casi), microftalmia (2 casi), atrofia del globo (un caso) e ascesso retrobulbare (un caso).

Le patologie oculari ereditarie sono risultate il 48,9% delle patologie complessivamente diagnosticate in questa razza.

Summary

In this study 122 Boxer dogs, referred to a specialist for eye problems, were evaluated. The dogs are 82 males and 40 females, average age is 4,9 years with a

minimum of 1 month and a maximum of 12 years. The pathology is bilateral in 43 cases. Overall the following eye pathologies have been diagnosed: distichiasis (13 cases), ectropion (9 cases), entropion (5 cases), ectopic cilia (5 cases), eyelid papilloma (3 cases), eyelid adenoma (2 cases), eyelid laceration (2 cases), eyelid mast cell tumor (1 case), conjunctival hemangioma (3 cases), lacrimal micropuncta (4 cases), atresia of lacrimal puncta (3 cases), follicular conjunctivitis (18 cases), third eyelid gland prolapse (8 cases), persistent corneal erosion (54 cases), corneal dystrophy (6 cases), corneal penetrating injury (4 cases), neurotrophic ulcer (one case), corneal perforation (one case), adherent leukoma (one case), chemical burn (one case), corneal foreign body (one case), KCS (one case), PPM (5 cases), irideal atrophy (4 cases), irideal melanoma suspicion (3 cases), irideal cyst (un case), irideal prolapse (one case), glaucoma (2 cases), cataract (9 cases), PHA (2 cases), PHPV (one case), optical neuritis (one case), SARD (one case), Horner's syndrome (2 cases), microphthalmia (2 cases), globe atrophy (one case) e retrobulbar abscess (one case).

Hereditary eye pathology have been 48,9 % of all pathologies that were diagnosed in this breed.

Résumé

Dans cette étude nous avons soumis à une visite specialistic 122 Boxer pour un problème oculaire. Nous avons examiné 82 mâles et 40 femelles, l'âge moyen est de 4,9 années, la plus bas est de 1 mois et la plus grande est de 12 années. La pathologie est bilatérale dans 43 cas. En conclusion, on a diagnostiqué: distichiasis (13 cas), ectropion (9 cas), entropion (5 cas), cil ectopique (5 cas), papillome palpébral (3 cas), adénome palpébral (2 cas), lacération palpébral (2 cas), mastocytoma palpébral (un cas), hémangiome conjonctif (3 cas), micropoint lacrimon (4 cas), atresie des points lacrimaux (3 cas), conjonctivite folliculaire (18 cas), prolapse de la glande de la troisième paupière (8 cas), érosion récurrent de la cornée (54 cas), dystrophie cornéenne (6 cas), plaie cornéenne perforante (4 cas), ulcère neurotrophique (un cas), perforation cornéenne (un cas), leucome cicatriciel (un cas), ustion chimiste cornéenne (un cas), corps étranger cornéenne (un cas), KCS (un cas), PPM (5 cas), atrophie sénile de l'iris (4 cas), mélanome de l'iris suspect (3 cas), kyste de l'iris (un cas), prolapse de l'iris (un cas), glaucome (2 cas), cataracte (9 cas), PHA (2 cas), PHPV (un cas), neurite optique (un cas), SARD (un cas), Syndrome de Horner (2 cas), microphthalmie (2 cas), atrophie du globe oculaire (un cas) et abcès arrière-orbitale (un cas).

Les pathologies oculaire héréditaire sont résultées le 48,9% de toutes les pathologies diagnostiquées dans cette race.

Introduzione

Questa razza nasce ufficialmente nel 1895; la struttura forte, molossoide del Boxer deriva dai grandi cani dei romani e dai successivi accoppiamenti con razze europee: il Bullenbeiszer ed il Barenbeiszer, caratterizzati da fisico muscoloso, pelo corto e l'attitudine ad affrontare senza addestramento animali forti e pericolosi come i bovini. In seguito queste razze sono state incrociate con gli antenati del Mastiff e

del Bulldog. Nonostante le origine tedesche il suo nome, inglese, descrive in modo appropriato lo stile di lotta di questa razza che utilizza molto le zampe anteriori ed è molto agile su quelle posteriori.

Agli inizi del '900 questa razza è stata definita da difesa e da utilità e gli allevatori ne sfruttarono le doti fisiche e caratteriali per selezionare un cane militare compatto e atletico, da utilizzare nell'esercito e in polizia per la ricerca e il soccorso e come cane da difesa e obbedienza, anche se, con la fine della guerra, l'allevamento del Boxer venne orientato più sulla selezione morfologica, proponendolo come cane da famiglia.

La testa è l'elemento caratteristico del Boxer, nobile, mai pesante, né troppo leggera, proporzionata al corpo, asciutta con cranio stretto e con poche rughe, solo quando è in attenzione. La lunghezza del naso sta al cranio nella proporzione di 1:2, la fronte presenta un leggero solco, stop ben marcato e dorso del naso che termina sul tartufo nero, leggermente rincagnato e con narici larghe. Le guance sono fortemente sviluppate, la dentatura è forte e con i denti il più possibile allineati; le labbra completano la forma del muso, quello superiore è spesso e riempie lo spazio vuoto determinato dal prognatismo ed è sostenuto dai canini superiori inseriti nella mascella larga, ben distanti l'uno dall'altro, e poggia sul labbro inferiore senza superarlo troppo per non farlo scomparire o troppo poco per non scoprire i denti della mandibola.

Gli occhi del Boxer sono di colore marrone scuro e di medie dimensioni, non devono essere né troppo piccoli, né sporgenti, ma devono esser inseriti profondamente. Lo sguardo deve esprimere energia e intelligenza, non deve apparire minaccioso o insidioso.

Il College Americano degli Oftalmologi Veterinari riporta come patologie oculari supposte di natura ereditaria nel Boxer: la distichiasi, l'ectropion, la distrofia corneale, l'erosione corneale recidivante e la cataratta (1).

Questo studio si prefigge di riportare la nostra esperienza relativamente alle patologie oculari riscontrate nei cani di razza Boxer presentatisi alla nostra attenzione per una visita specialistica.

In particolar modo abbiamo cercato di evidenziare e differenziare le patologie oculari di sospetta natura ereditaria da quelle definite di natura acquisita.

Materiali e metodi

In questo studio sono stati presi in considerazione 122 cani di razza Boxer sottoposti a visita oftalmologica per problemi oculari.

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad una visita oculistica completa, per cui sono stati valutati la reazione di ammiccamento alla minaccia, i riflessi pupillari diretti e consensuali tramite transilluminatore di Finoff, la produzione lacrimale (Schirmer tear test, Schering Plough Animal Health) e la pressione intraoculare mediante tonometria per applanazione con Tono-Pen® VET, previa instillazione locale di anestetico locale a base di ossibuprocaina cloridrato (Novesina 0,4% collirio, Novartis). Inoltre è stato eseguito il test di colorazione con fluoresceina (Fluorescein sterile strips, HS International).

L'esame del segmento anteriore è stato effettuato mediante biomicroscopia

con lampada a fessura KOWA SL-15, mentre il segmento posteriore è stato valutato mediante oftalmoscopia diretta con PanOptic (Welch Allyn) e indiretta con HEINE OMEGA 500®, previa dilatazione pupillare con tropicamide 0,5% e fenilefrina 10% (Visumidriatic Fenilefrina collirio, Visufarma).

Nei soggetti sottoposti ad intervento chirurgico per l'asportazione di neoformazioni, queste ultime sono state inviate a laboratori anatomo-patologici per l'esecuzione dell'esame istologico.

Risultati

L'età media dei 122 soggetti presi in esame è risultata di 4,9 anni, con un minimo di 1 mese ed un massimo di 12 anni. Sono stati esaminati 82 maschi e 40 femmine. In 41 cani è stato colpito solo l'occhio destro, in 42 solo il sinistro, per un totale di 83 casi monolaterali, e 43 bilaterali. Trentasette cani hanno riportato contemporaneamente patologie oculari diverse tra loro e 3 cani hanno presentato diverse patologie nel corso del tempo (Tab 1).

	SESSO	ETÀ ANNI	OCCHIO	PATOLOGIA
1	M	1	OS	Erosione corneale recidivante
		8	OD	Erosione corneale recidivante
2	M	7	OS	Papilloma palpebra superiore
3	M	1	OS	Erosione corneale recidivante
4	F	8	OU	Atrofia iridea, Neurite ottica OD
5	M	3	OS	Congiuntivite follicolare
6	M	3	OU	Entropion mediale palpebra inferiore
		5	OU	Congiuntivite follicolare
		6	OD	Erosione corneale recidivante
7	M	2	OD	Erosione corneale recidivante
8	M	7	OD	Erosione corneale recidivante
		8	OS	Erosione corneale recidivante
9	F	11	OD	Ulcera neurotrofica
10	M	1,8	OU	Entropion mediale palpebra inferiore, Ectropion centrale palpebra inferiore, Distichie
11	M	3	OD	Glaucoma
12	M	8	OD	Erosione corneale recidivante
13	F	0,11	OS	Prolasso ghiandola terza palpebra
14	M	0,7	OU	Entropion mediale palpebra inferiore
15	M	0,7	OS	Prolasso ghiandola terza palpebra
16	M	10	OS	Adenoma palpebra inferiore
17	M	6	OS	Erosione corneale recidivante

18	M	4	OD	Congiuntivite follicolare
19	M	7	OU	Congiuntivite follicolare
20	F	4	OU	Congiuntivite follicolare, Distichie, Adenoma palpebra superiore OS
21	M	9	OS	Lacerazione palpebra inferiore e terza palpebra
22	M	0,4	OS	Erosione corneale recidivante
23	F	10	OS	Erosione corneale recidivante
24	M	0,1	OU	Microftalmia, PPM
25	M	4	OU	Entropion mediale palpebra inferiore, Ectropion centrale palpebra inferiore, Congiuntivite follicolare
26	F	2,5	OU	Entropion mediale palpebra inferiore
27	M	5	OU	Distrofia corneale, Congiuntivite follicolare
28	M	8	OS	Erosione corneale recidivante
29	F	7	OS	Erosione corneale recidivante
30	M	0,7	OU	Congiuntivite follicolare, Prolasso ghiandola terza palpebra OD
31	F	1	OS	Perforazione corneale
32	M	8	OD	Erosione corneale recidivante
33	M	8	OS	Erosione corneale recidivante
34	M	7	OS	Cisti iridea
35	M	3,5	OU	Congiuntivite follicolare, Erosione corneale recidivante OS
36	M	7	OD	Erosione corneale recidivante
37	M	2,6	OU	Congiuntivite follicolare
38	M	1,6	OU	Micropunto lacrimale inferiore, Ectropion centrale palpebra inferiore
39	M	0,7	OU	Prolasso ghiandola terza palpebra
40	F	4	OS	Ciglio ectopico, Erosione corneale recidivante
41	F	1,2	OD	Ciglio ectopico, Erosione corneale recidivante
42	F	1	OD	Ciglio ectopico
43	M	0,4	OU	Micropunto lacrimale superiore, PPM OD, PHA OS, Ectropion centrale palpebra inferiore
44	M	0,7	OU	Atresia dei punti lacrimali inferiore, Congiuntivite follicolare, PPM
45	F	2	OS	Ciglio ectopico
46	F	1	OU	Distichie, Ciglio ectopico OS, Erosione corneale recidivante OS

47	F	0,7	OU	Distichie, Prolasso ghiandola terza palpebra OS
48	F	0,7	OD	Prolasso ghiandola terza palpebra
49	F	0,8	OU	Prolasso ghiandola terza palpebra
50	F	6,5	OD	Erosione corneale recidivante
51	M	10	OS	Erosione corneale recidivante
52	M	0,5	OU	Prolasso ghiandola terza palpebra OD, Micropunto lacrimale inferiore
53	F	2	OS	Erosione corneale recidivante
54	F	10	OS	Cataratta, PPM
55	M	10	OD	Sindrome di Horner
56	F	11	OD	Sospetto melanoma irideo
57	M	0,3	OS	Ferita corneale penetrante
58	F	8	OU	Erosione corneale recidivante OS, Distrofia corneale OD
59	M	8	OS	Erosione corneale recidivante
60	F	8	OS	Erosione corneale recidivante
61	M	6	OS	Leucoma cicatriziale
62	F	12	OU	Distrofia corneale, Emangioma congiuntivale palpebra inferiore OS, Atrofia iridea
63	M	3	OU	Erosione corneale recidivante OD, Emangioma congiuntivale palpebra inferiore OS
64	F	5	OD	Atrofia del globo
65	M	8	OD	Erosione corneale recidivante
66	M	0,6	OS	Ustione chimica
67	M	11	OS	Erosione corneale recidivante
68	F	9	OD	Erosione corneale recidivante
69	M	0,9	OU	Punto lacrimale inferiore imperforato OD, Micropunto inferiore OS, Distichie
70	M	5	OU	Cataratta
71	M	10	OS	Mastocitoma palpebra superiore
72	M	10	OD	Erosione corneale recidivante
73	M	8	OD	Erosione corneale recidivante
74	M	1,3	OD	Congiuntivite follicolare
75	M	0,3	OD	Ferita corneale penetrante
76	F	7	OS	Erosione corneale recidivante
77	F	0,3	OD	PHPV, PHA, Microftalmia, Cataratta
78	M	5	OU	Distrofia corneale

79	F	7,5	OD	Erosione corneale recidivante
80	M	6	OU	Erosione corneale recidivante
81	F	6	OS	Erosione corneale recidivante
82	M	12	OS	Sindrome di Horner
83	M	1	OU	Congiuntivite follicolare, Distichie OS
84	F	3,5	OD	Cataratta
85	M	5	OD	SARD
86	F	7,5	OS	Erosione corneale recidivante
87	F	0,1	OD	Ferita corneale penetrante
88	M	5	OS	Sospetto melanoma irideo
89	M	7	OS	Erosione corneale recidivante
90	M	7	OU	Erosione corneale recidivante OS, Atrofia iridea
91	M	10	OD	Erosione corneale recidivante
92	F	8	OS	Erosione corneale recidivante
93	M	2,5	OU	Distichie, Atresia dei punti lacrimali superiori, Distrofia corneale OD, Cataratta, Ectropion centrale palpebra inferiore Congiuntivite follicolare
94	M	2	OU	Distichie, Ectropion centrale ventrale, Distrofia corneale, Cataratta
95	M	2,4	OU	Congiuntivite follicolare, Ectropion centrale palpebra inferiore
96	M	0,9	OU	PPM, Ectropion centrale palpebra inferiore
97	M	2	OU	Congiuntivite follicolare, Ectropion centrale palpebra inferiore
98	F	8	OS	Erosione corneale recidivante
99	M	8	OD	Erosione corneale recidivante, Cataratta
100	M	9	OD	Erosione corneale recidivante
101	F	6	OD	Erosione corneale recidivante
102	M	0,8	OS	Erosione corneale recidivante
103	F	8	OD	Erosione corneale recidivante
104	M	7	OS	Erosione corneale recidivante
105	M	11	OS	Erosione corneale recidivante
106	F	7	OD	Erosione corneale recidivante
107	F	8	OU	Erosione corneale recidivante OD, KCS OS
108	M	7	OD	Erosione corneale recidivante
109	M	6	OD	Erosione corneale recidivante
110	M	0,9	OD	Papilloma palpebra inferiore

111	M	7	OS	Papilloma palpebra superiore
112	M	10,5	OU	Glaucoma cronico OD, sospetto melanoma irideo OS, Atrofia iridea OS
113	M	0,8	OD	Ferita corneale penetrante
114	M	2,5	OD	Lesione retrobulbare
115	M	1,5	OU	Distichie, Cataratta OD
116	M	1	OU	Distichie, Congiuntivite follicolare
117	M	10	OU	Distichie, Erosione corneale recidivante
118	M	1	OU	Distichie, Congiuntivite follicolare
119	F	3	OU	Distichie, Corpo estraneo corneale OD
120	F	0,3	OD	Lacerazione palpebrale
121	M	3	OS	Emangioma congiuntivale palpebra superiore
122	M	12	OD	Prolasso dell'iride

Tabella 1: patologie oculari riscontrate nel Boxer

OD: occhio destro, OS: occhio sinistro, OU entrambi gli occhi

Complessivamente sono stati diagnosticati 13 casi di distichiasi (12 bilaterali); 9 casi bilaterali di ectropion centrale della palpebra inferiore (foto 1); 5 casi bilaterali di entropion mediale della palpebra inferiore; 5 casi di ciglia ectopiche; 3 casi di papilloma, due riguardanti la palpebra superiore ed uno quella inferiore; 2 casi di adenoma, di cui uno della palpebra superiore e l'altro di quella inferiore (foto 2); 2 casi di lacerazione delle palpebre, di cui uno interessava sia quella superiore che quella inferiore e l'altro quella inferiore e la terza palpebra; ed un caso di mastocitoma della palpebra superiore.

Sono stati evidenziati 3 casi di emangioma congiuntivale, due riguardanti la palpebra inferiore ed uno quella superiore; 4 casi di micropunto lacrimale (3 bilaterali), di cui, tre riguardanti quello inferiore e uno quello superiore; 3 casi di atresia dei punti lacimali (2 bilaterali), di cui due riguardanti quello inferiore e uno quello superiore; 18 casi di congiuntivite follicolare (15 bilaterali); 8 casi di prolasso della ghiandola della terza palpebra (2 bilaterali).

Sono stati diagnosticati 54 casi di erosione corneale recidivante (2 bilaterali) (foto 3); 6 casi di distrofia corneale (4 bilaterali); 4 casi di ferita corneale penetrante; singoli casi di ulcera neurotrofica, perforazione corneale, leucoma cicatriziale, ustione chimica, corpo estraneo corneale e KCS (cheratocongiuntivite secca); ed inoltre 5 casi di PPM (persistenza della membrana pupillare) (3 bilaterali) (foto 4); 4 casi di atrofia dell'iride (3 bilaterali); 3 casi di sospetto melanoma irideo; e singoli casi di cisti iridea (foto 5) e prolasso dell'iride (foto 6); 2 casi di glaucoma (foto 7); 9 casi di cataratta (2 bilaterali) (foto 8); 2 casi di PHA (persistenza dell'arteria ialoidea); singoli casi di PHPV (persistenza del vitreo primario iperplastico), neurite ottica e SARD (degenerazione retinica improvvisa acquisita); 2 casi di sindrome di Horner; 2 casi di microftalmia (1 bilaterale) e singoli casi di atrofia del globo e massa retrobulbare.

Le diverse patologie che hanno interessato i Boxer presi in esame sono state 37. Complessivamente gli occhi interessati sono stati 169, per un totale di 245 patologie, di cui 120 ereditarie e 125 acquisite.

Cinque dei cani con problemi di distichiasi sono stati sottoposti ad intervento di crioepilazione, e otto sono stati sottoposti a epilazione manuale. In entrambi i casi è stato prescritto un trattamento locale con cloramfenicolo unguento oftalmico (TID per 7 giorni). Dei nove casi di ectropion, due sono stati sottoposti a intervento di blefaroplastica seguito da trattamento locale a base di cloramfenicolo unguento oftalmico (QID per 12 giorni), sette, invece, non sono stati trattati per volere del proprietario. Dei cinque casi di entropion mediale della palpebra inferiore, due sono stati sottoposti ad intervento chirurgico di blefaroplastica ed in seguito sono stati trattati localmente con cloramfenicolo unguento oftalmico (QID per 12 giorni), tre non hanno subito nessun trattamento per volere del proprietario. I cinque soggetti che presentavano ciglia ectopiche sono stati sottoposti ad intervento chirurgico per la rimozione del ciglio e sono stati sottoposti ad un trattamento locale con cloramfenicolo unguento oftalmico (QID per 12 giorni). I tre cani con papilloma sono stati sottoposti a chirurgia ed in seguito è stato loro somministrato localmente cloramfenicolo unguento oftalmico (QID per 12 giorni). I due casi di adenoma delle ghiandole di Meibomio sono stati sottoposti a intervento chirurgico per l'asportazione della neoformazione e successivamente sono stati trattati con amoxicillina e acido clavulanico per os (12,5 mg/Kg BID per 5 giorni) e localmente con cloramfenicolo unguento oftalmico (QID per 12 giorni). I due cani che presentavano una lacerazione delle palpebre sono stati sottoposti ad intervento di sutura della ferita e trattati localmente con cloramfenicolo unguento oftalmico (QID per 12 giorni). Il cane con mastocitoma è stato sottoposto ad intervento chirurgico per la rimozione della neoformazione e successivamente è stato trattato con amoxicillina e acido clavulanico per os (12,5 mg/Kg BID per 5 giorni) e localmente con cloramfenicolo unguento oftalmico (QID per 12 giorni).

I tre soggetti con emangioma sono stati sottoposti a intervento chirurgico di asportazione e trattati successivamente con amoxicillina e acido clavulanico per os (12,5 mg/Kg BID per 5 giorni) e localmente con cloramfenicolo unguento oftalmico (QID per 12 giorni). I quattro pazienti che presentavano micropunto lacrimale e i tre con atresia dei punti lacrimali non sono stati sottoposti a nessun intervento chirurgico per volere dei proprietari. I casi di congiuntivite follicolare sono stati trattati con colliri a base di cortisone (QID per 15 giorni), un caso è stato trattato per un'erosione corneale recidivante, sino alla guarigione della lesione, in seguito è stato somministrato un unguento oftalmico a base di desametasone (BID per 15 giorni). In due soggetti che presentavano sintomi di allergia generalizzata è stato somministrato anche idroxizina cloridrato per os (2mg/Kg BID per 20 giorni) e vitamina E in olio di semi di ribes nero in pasta per os (SID per 30 giorni), ad uno di questi soggetti, che al controllo non presentava un miglioramento significativo, è stato aggiunto prednisone per os (1 mg/Kg a scalare per un totale di 12 giorni). Tutti i cani con prolasso della ghiandola della terza palpebra sono stati sottoposti ad intervento di riposizionamento della ghiandola mediante tecnica pocket seguito da un trattamento locale con cloramfenicolo unguento oftalmico (QID per 12 giorni).

Nei 54 casi di erosione corneale recidivante sono stati eseguiti debridement e

cheratotomia a griglia, seguiti da un trattamento locale a base di cloramfenicolo collirio (QID per 14 giorni) e atropina collirio 1% (BID per 3 giorni e successivamente solo la mattina per 10 giorni). I sei cani che presentavano distrofia corneale sono stati sottoposti ad accertamenti, in particolare è stato consigliato di effettuare esami ematici per valutare il profilo metabolico del soggetto. Dei quattro cani con ferita corneale penetrante, in uno è stata effettuata la sutura della cornea seguita da flap congiuntivale peduncolato, ed è stato somministrato un collirio a base di ofloxacinasi sei volte al dì, atropina collirio 1% BID, ac. clavulanico e amoxicillina (12,5 mg/Kg BID) per os, e prednisone (1 mg/Kg due volte al dì a scalare) per os, gli altri tre sono stati trattati con collirio a base di ofloxacinasi sei volte al dì, tobramicina collirio sei volte al dì, atropina collirio 1% BID i primi tre giorni e successivamente SID, acetilcisteina collirio TID e cefalosporine (20 mg/kg BID) per os. Il cane con ulcera neurotrofica è stato sottoposto a trattamento locale con cloramfenicolo unguento oftalmico (TID sino a guarigione dell'ulcera) e a terapia permanente con lacrime artificiali (TID). Il cane con perforazione corneale è stato sottoposto per volere del proprietario a terapia locale con tobramicina collirio e ofloxacinasi collirio, alternati, sei volte al dì, acetilcisteina collirio (TID) e atropina collirio (SID) a giorni alterni, e a terapia sistemica con cefalosporina per os (20 mg/Kg BID per 10 giorni). Il soggetto con leucoma cicatriziale non è stato sottoposto ad alcun trattamento per volere del proprietario. Il caso di ustione chimica è stato trattato localmente con diclofenac collirio (QID per 2 giorni), fluorometolone collirio (TID per 7 giorni) e xantopterina associata a cloramfenicolo collirio (QID per 7 giorni). Il paziente con corpo estraneo corneale è stato trattato localmente con un collirio a base di ofloxacinasi (QID per 10 giorni). Il cane con KCS è stato sottoposto a terapia permanente con ciclosporina A unguento oftalmico (BID), lacrime artificiali (TID) e tobramicina associata a desametasone collirio (BID per 20 giorni).

I cinque soggetti che presentavano PPM, i quattro soggetti con atrofia dell'iride, i tre cani con sospetto melanoma irideo e il cane con cisti iridea non sono stati sottoposti ad alcun tipo di trattamento. Al cane con prolasso dell'iride è stato consigliato il trattamento chirurgico con flap congiuntivale, ma per volere del proprietario si è optato per la terapia medica a base di amoxicillina e acido clavulanico per os (12,5 mg/Kg BID per 5 giorni) e localmente con tobramicina, ofloxacinasi ogni due ore, alternati ad acetilcisteina collirio.

I cani con glaucoma sono stati sottoposti a enucleazione e successivamente è stata somministrata amoxicillina e acido clavulanico per os (12,5 mg/Kg BID per 5 giorni) e cloramfenicolo unguento oftalmico localmente (QID per 12 giorni).

Dei nove casi di cataratta solo tre sono stati sottoposti a intervento di facoeulsificazione, mentre gli altri sei non sono stati trattati per volere del proprietario. I due cani con PHA e il soggetto con PHPV non sono stati sottoposti ad alcun trattamento. Il cane con neurite ottica è stato trattato con prednisone (1 mg/Kg due volte al dì a scalare per un totale di 12 giorni) per os ed è stato sottoposto a visita neurologica. Il soggetto con SARD non è stato sottoposto ad alcun trattamento.

I due pazienti con sindrome di Horner non sono stati sottoposti ad alcun accertamento per volere dei proprietari. I due cani con microftalmia non sono stati sottoposti ad alcun trattamento. Il caso di atrofia del globo secondario a ferita cornea-

le è stato trattato con amoxicillina e acido clavulanico per os (12,5 mg/kg BID per 10 giorni), prednisone per os (1 mg/Kg a scalare per un totale di 20 giorni) e tobramicina collirio sei volte al di. Il soggetto con lesione retrobulbare è stato sottoposto ad intervento chirurgico di drenaggio, in quanto in seguito all'esame ecografico è stata diagnosticata una forma ascessuale, in seguito è stato trattato con amoxicillina e acido clavulanico per os (12,5 mg/kg BID per 10 giorni).

I cani sottoposti sia a terapia farmacologica sia chirurgica hanno presentato la completa risoluzione del quadro clinico, discorso a parte meritano i due cani con ferita corneale penetrante che hanno conservato la struttura anatomica dell'occhio, ma non la funzionalità. Un miglioramento significativo, ma non una guarigione definitiva, si è avuto nel cane interessato da KCS.

Discussione e considerazioni conclusive

Da questo lavoro emerge come il Boxer sia colpito in misura maggiore, anche se in modo non significativo, da patologie di tipo acquisito (51,1%) piuttosto che da patologie di tipo ereditario (48,9%). Le patologie più frequenti sono state osservate a carico del segmento anteriore dell'occhio (97,9%).

In particolare, a carico della cornea (33,9%), sono risultate essere erosione corneale recidivante, distrofia corneale, ferita corneale penetrante; a carico delle palpebre (24,9%) distichiasi, ectropion ed entropion; a livello della terza palpebra (13,9%) congiuntivite follicolare e dell'apparato lacrimale (8,9%) prolasso della ghiandola della terza palpebra.

Per quanto riguarda l'età, possiamo evidenziare come le patologie oculari colpiscano soggetti di età adulta (4,9 anni), infatti, pur non presentandosi direttamente alla nascita o nei primi anni di vita dell'animale, molte patologie compaiono in fase avanzata, poiché la predisposizione al loro sviluppo può presentarsi in concomitanza con il raggiungimento dell'età adulta da parte dell'animale.

Per quanto riguarda il sesso si può notare come il numero dei maschi sia doppio rispetto a quello delle femmine.

Per quanto riguarda le varie patologie oculari riscontrate, le distichie sono ciglia anomale che, di solito, fuoriescono dagli sbocchi delle ghiandole di Meibomio ed i relativi follicoli piliferi sono localizzati sul margine palpebrale in prossimità o in corrispondenza della base delle ghiandole stesse. È una patologia che riconosce una predisposizione di razza, può essere mono o bilaterale e possono essere coinvolte sia la palpebra superiore sia quella inferiore. Spesso le distichie sono chiare e il muco può mascherare la loro presenza. Se sono morbide e non infastidiscono l'animale possono non richiedere alcun trattamento. In caso contrario, se sono di maggiori dimensioni e spessore, possono provocare lacrimazione e blefarospasmo accompagnati o meno da lesioni corneali. Il trattamento più semplice consiste nella rimozione manuale, ma è una soluzione temporanea, mentre le terapie definitive consistono nell'elettrodepilazione e nella crioepilazione (8, 9, 12).

L'ectropion consiste nella deviazione verso l'esterno del margine palpebrale, quando la palpebra inferiore non si trova in posizione corretta, si forma una sacca ed il liquido lacrimale non è in grado di svolgere la sua normale funzione di pulizia,

protezione e lubrificazione dell'occhio. Il sacco congiuntivale risulta quindi cronicamente infiammato come risultato della sua esposizione permanente all'aria, alla polvere e ai batteri. I cani affetti da ectropion, spesso, presentano anche una rima palpebrale sovradimensionata. Gran parte delle forme di ectropion sono ereditarie, la forma acquisita è rara e può essere causata da una retrazione cicatriziale in seguito ad una lesione o come risultato di un'errata, eccessiva, correzione in corso di entropion. Se il difetto è live non sono necessari trattamenti, nei casi più gravi, invece, è necessario ricorrere alla correzione chirurgica (8, 9, 12, 15).

A carico della terza palpebra, si è evidenziata la congiuntivite follicolare che è caratterizzata dallo sviluppo e dall'ipertrofia dei follicoli localizzati sulla superice interna di questa struttura. È una patologia che spesso si osserva nei cani giovani, da tre mesi a tre anni d'età, sovente è stagionale e si sviluppa nel periodo che va da marzo a luglio, e nella maggior parte dei casi interessa cani predisposti all'atopia. La causa può essere un'irritazione cronica, oppure un fenomeno di ipersensibilizzazione, per cui, è possibile sospettare una base immunomediata della patologia.

Il trattamento prevede l'instillazione locale di un collirio antibiotico-antinfiammatorio nei casi più lievi, sino a giungere all'intervento chirurgico, tuttora controverso, nei casi più gravi, che consiste nell'ablazione dei follicoli mediante abrasione meccanica o per cauterizzazione (3, 5, 8, 9, 12).

Il prolasso della ghiandola della terza palpebra, è una patologia, di solito, osservata nei cani di età inferiore ad un anno. Poiché è stata notata una predisposizione nelle razze brachicefaliche si sospetta un difetto anatomico genetico. Si ipotizza che sussista una lassità o una debolezza nelle inserzioni di tessuto connettivo che tiene in posizione la ghiandola. La ghiandola protrude al di sopra e tra il margine libero della terza palpebra ed il globo e può presentarsi iperplasica ed infiammata. Può essere unilaterale o bilaterale, raramente concomitante, ma più spesso si presenta in momenti successivi. Il trattamento con colliri antibiotici e antinfiammatori, permette, in alcuni casi, il ritorno in sede della ghiandola, ma il solo trattamento definitivo è il riposizionamento chirurgico (3, 8, 9, 12).

Le erosioni corneali recidivanti, chiamate anche erosioni corneali superficiali o ulcere refrattarie o indolenti o ulcere del boxer, sono tipiche di questa razza benché possano interessarne anche altre, e come dice il nome stesso hanno la tendenza a ripresentarsi. Sono comunemente diagnosticate in soggetti la cui età media è di 6,6 anni, possono colpire entrambi gli occhi e si è notato che le femmine sono più predisposte. Possono essere primarie e svilupparsi spontaneamente o secondarie ad altre patologie quali distichiasi, ciglia ectopiche e trichiasi. L'adesione dell'epitelio corneale allo stroma dipende dalla sua membrana basale e dagli emidesmosomi associati alle cellule basali. Nel Boxer, queste lesioni sono causate dall'allontanamento dell'epitelio dalla membrana basale sottostante, in quanto questi cani hanno un numero di emidesmosomi diminuito e un'anomalia della membrana basale dell'epitelio. L'epitelio non aderisce allo stroma sottostante, ma spesso si accumula alla periferia dell'ulcera, causando un aspetto arrotondato verso l'alto e la formazione di un labbro caratteristico. Le aree colpite sono, solitamente di 3-4 mm, hanno un contorno raggiato, provocano dolore e si colorano con fluoresceina. La terapia tradizionale consiste nel debridement dell'epitelio non adeso con o senza agenti chimici, mediante

un tampone sterile. La cheratotomia a griglia completa il trattamento e si esegue con un ago da 25G disegnando una griglia sulla membrana basale. La rimozione dell'epitelio anormale permette la moltiplicazione dell'epitelio adiacente e la produzione di membrana basale con emidesmosomi normali. In seguito il paziente eseguirà una terapia a base di antibiotici locali e midriatici cicloplegici (2, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14).

La distrofia corneale è un'opacità corneale primaria che si presenta bilaterale e simmetrica, ha origine ereditaria e non è associata ad infiammazione corneale o a una patologia sistemica, non ha carattere progressivo o solo minimamente progressivo. Può interessare l'epitelio, lo stroma o l'endotelio ed è caratterizzata da depositi di cristalli di colesterolo tra le fibrille di collagene a vari livelli dello stroma, ma soprattutto a livello sub-epiteliale, mantenendo l'epitelio intatto e di spessore normale (7, 8, 9, 11).

Per cataratta s'intende qualsiasi opacità non fisiologica a carico della lente. Questa patologia è generalmente provocata dalla minore assunzione di ossigeno e dalla maggiore penetrazione di acqua nella lente, che provoca edema e di conseguenza disidratazione (8, 9, 12). La formazione di una cataratta può essere secondaria ad un qualsiasi processo che alteri l'omeostasi del microambiente della lente, quindi, la formazione di una cataratta è il comune punto finale per molti danni verso la lente. I danni potenziali comprendono traumi, malattie metaboliche, come il diabete mellito, danni ossidativi da radicali liberi e da radiazioni ultraviolette e alterazioni dovute a lussazione della lente, displasia della retina, atrofia progressiva della retina e infiammazioni secondarie ad uveite o glaucoma (12, 13). In tutti i casi in cui si ha la formazione di una cataratta senza che si siano verificati i fenomeni sopradetti è lecito pensare che la cataratta sia di origine ereditaria.

Le modificazioni genetiche del Boxer, come nelle altre razze canine, sono state originate sia inconsapevolmente, sia ricercando appositamente caratteristiche peculiari che potessero contraddistinguere la razza. Pertanto, alcune affezioni sono insorte, sia casualmente, sia come conseguenza della selezione. Mentre le patologie acquisite non si possono evitare e non dipendono dagli accoppiamenti effettuati dagli allevatori, quelle ereditarie, con le loro gravi manifestazioni cliniche, devono essere prevenute. I difetti ereditari, infatti, possono essere eliminati o può essere ridotta al massimo la loro incidenza, mediante il controllo degli accoppiamenti, in modo tale da far riprodurre solo i soggetti sani. Le erosioni corneali recidivanti, pur non essendo patologie invalidanti, in quanto con un'idonea terapia possono essere controllate, sono patologie subdole poiché tendono a ripresentarsi nel corso della vita del soggetto. La cataratta, invece, che è considerata una patologia ereditaria, è estremamente invalidante, e può frequentemente portare l'animale alla cecità, se non s'interviene chirurgicamente. Al fine di prevenire le patologie ereditarie, si rende necessario sensibilizzare gli allevatori a proposito di questo problema, in modo che selezionino soggetti esenti facendo riprodurre solamente cani che non presentino i segni clinici di patologie ereditarie.

Per molte patologie si parla di "predisposizione razziale", poiché non sempre è possibile dimostrare il comportamento ereditario di determinate patologie. Tuttavia, la crescente incidenza di alcune forme, all'interno di specifiche razze, ed il Boxer ne è un esempio, costituisce l'indicazione iniziale che tali manifestazioni patologiche siano determinate geneticamente.

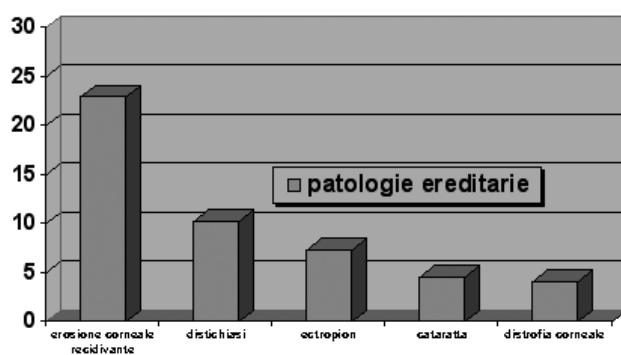


Tabella 2: distribuzione delle patologie ereditarie.

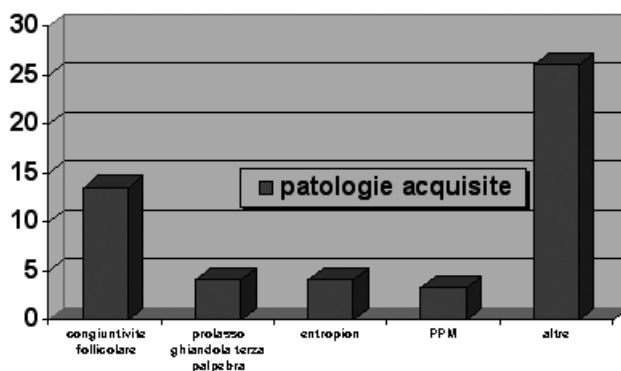


Tabella 3: distribuzione delle patologie acquisite.

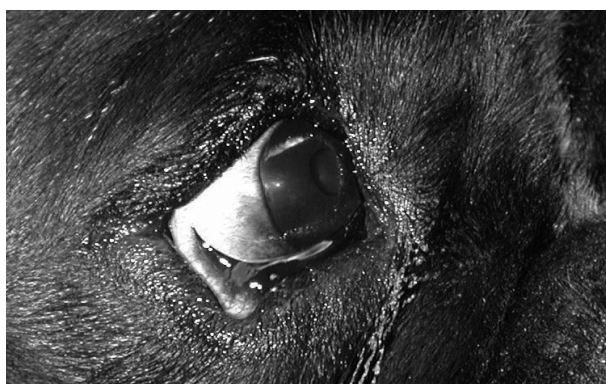


Foto 1: ectropion centrale palpebra inferiore dell'occhio destro.

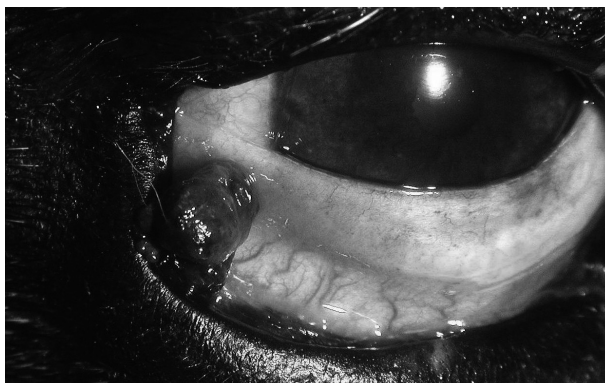


Foto 2: adenoma della palpebra inferiore dell'occhio sinistro.



Foto 3: erosione corneale recidivante dell'occhio sinistro.

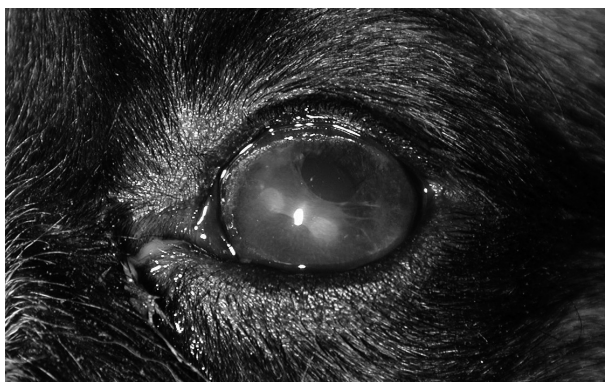


Foto 4: PPM dell'occhio sinistro.



Foto 5: cisti iridea dell'occhio sinistro.

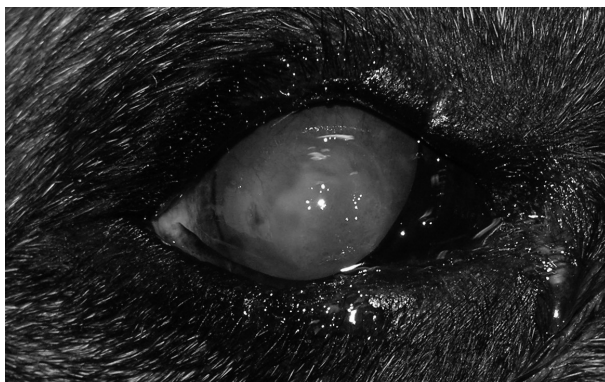


Foto 6: prolasso dell'iride dell'occhio destro.



Foto 7: glaucoma dell'occhio destro.

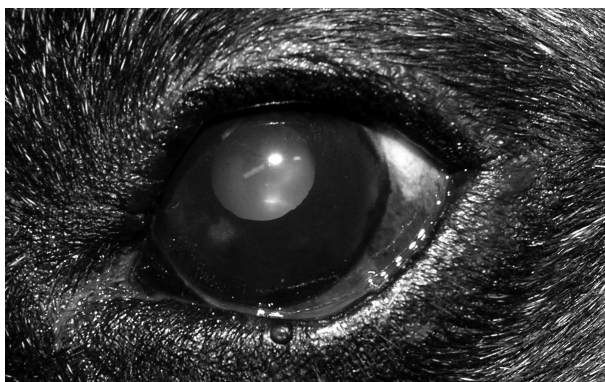


Foto 8: cataratta dell'occhio sinistro.

Bibliografia

1. ACVO Genetics Committee: Ocular disorders or suspected to be hereditary in dogs. ACVO ed., 2nd ed., 1996.
2. Bentley E. Spontaneous chronic corneal epithelial defects in dogs: a review. J Am Anim Hosp Assoc, 2005, 41 (3), 158-165.
3. Bouhanna L. Patologia della membrana nittitante. Summa, 2006, 2, 17-25.
4. Chavkin M.J., Riis R.C., Scherlie P.H. Management of a persistent corneal erosion in a boxer dog. Cornell Vet, 1990, 80 (4), 347-356.
5. Clerc B., Crasta M. Le affezioni infiammatorie della membrana nittitante nei carnivori domestici. Summa, 2001, 5, 23-28.
6. Cooley P.L., Dice P.F. Corneal dystrophy in the dog and cat. Vet Clin North Am: Small Anim Pract, 1990, 20 (3), 681-692.
7. Dice P.F. Primary corneal disease in the dog and cat. Vet Clin North Am: Small Animal Practice, 1980, 10 (2), 339-356.
8. Gelatt K.N. Veterinary ophthalmology. 3rd ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1999.
9. Martin C.L. Ophthalmic disease in veterinary medicine. Londra, Manson Publishing, 2005.
10. Roze M. Pathologie inflammatoire de la cornée. Prat Med Chir Anim Comp, 1997, 32, 93-102.
11. Sapienza J.S. Corneal disease of dogs and cats. Proc (Atti), 27° Congresso Wsava-Fecava-Avepa, Granada, 2002, 478-482.
12. Slatter D. Textbook of small animal surgery. Philadelphia W.B. Saunders Co, 2003.
13. Stades F.C., Boevé M.H., Neumann W., Wymann M. Ophthalmology for the Veterinary Practitioner. Hannover, Schlütersche GmbH & Co., 1998.
14. Stanley R.G., Hardman C., Johnson B.W. Results of grid keratotomy, superficial keratotomy and debridement for the management of persistent corneal erosion in 92 dogs. Vet Ophthalmol, 1998, 1, 233-238.

15. Van der Woerd A. Adnexal surgery in dogs and cats. *Vet Ophthalmol*, 2004, 7 (5), 284-290.

NUOVE OPPORTUNITÀ DI REDDITO PER L'IMPRENDITORE AGRICOLO*

A. Salghetti, G. Ferri**

PAROLE CHIAVE:

Imprenditore agricolo, multifunzionalità, reddito.

KEY WORDS:

Agricultural entrepreneur, multifunctionality, income.

Riassunto

Nuove opportunità di reddito per l'imprenditore agricolo.

La riforma della Politica Agricola Comunitaria e gli interventi legislativi nazionali hanno assegnato al settore agricolo nuove funzioni, allargando le opportunità d'impresa. La nostra analisi ha cercato di approfondire le conoscenze sul ruolo che l'imprenditore agricolo è chiamato a svolgere e le prospettive che si presentano per allargare il budget aziendale, grazie alla multifunzionalità. Le nuove competenze presuppongono una figura nuova di imprenditore agricolo, non solo rivolto alla produzione di beni alimentari ma con la preparazione necessaria a svolgere la funzione di erogatore di servizi alle persone, alla collettività e al territorio. In quest'ottica si prospettano nuove opportunità di occupazione e di reddito per il settore agricolo che possono trattenere nel primario più addetti, ma che possono richiamarne anche di nuovi dagli altri settori produttivi.

Summary

New income opportunities for the agricultural entrepreneur.

The reform of the Community Agricultural Policy and national legislative initiatives have assigned new functions to the agricultural sector, extending business opportunities. The aim of our paper is to make an in-depth analysis of the role that the agricultural entrepreneur is called upon to play, together with the perspectives in view for increasing the corporate budget, thanks to multifunctionality. These new areas of competence necessitate a new type of agricultural entrepreneur who is not focused solely on the production of food products but who also has the background required to be able to act as a provider of services to persons, to society at large and to the territory in general. From this standpoint, new opportunities for employment

* Lavoro eseguito con finanziamento FIL (ex quota 60%). Lo studio è frutto di un lavoro comune dei due autori. Tuttavia in sede di stesura del testo Andrea Salghetti ha redatto i paragrafi 1, 2, 3, 5, 6; mentre Giovanni Ferri ha redatto il paragrafo 4.

** Sezione di Risorse del Territorio, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.

and gain are in sight in the agricultural sector which will not only be able to prevent workers from abandoning the sector, but which will also be able to attract workers from other production sectors.

1. Introduzione

Il settore agricolo sta attraversando una fase di particolare difficoltà ed incertezza. Da una parte i prezzi dei prodotti agricoli alla produzione vengono penalizzati dalla concorrenza internazionale, a fronte di un disimpegno pubblico di sostegno dei prezzi, dall'altra parte le aziende agricole hanno difficoltà ad abbassare i costi di produzione per le ridotte dimensioni aziendali, che non consentono di avvalersi delle economie di scala (5).

In queste condizioni un numero sempre maggiore di aziende agricole è avviato alla precarietà, con il rischio di abbandono dell'attività e di uscita dal settore primario. Il conseguente esodo agricolo farà crescere la domanda d'occupazione in altri settori produttivi, in un momento già difficile per la crisi economica in corso nel Paese.

Pertanto, diventa importante ricercare altre opportunità di reddito che consentano almeno ad una parte di lavoratori agricoli precari di rimanere nel settore e consentire la prosecuzione dell'attività ad un numero maggiore possibile di aziende, specialmente nelle aree più svantaggiate.

La politica agricola, a livello comunitario e nazionale, è orientata in questa direzione, assegnando al settore primario nuovi compiti che vanno ben al di là della tradizionale funzione di approvvigionamento alimentare.

La multifunzionalità che viene riconosciuta oggi al settore agricolo rappresenta un svolta importante per il futuro della nostra agricoltura (9). L'estensione dei compiti assegnati all'agricoltura significa un riconoscimento pubblico di alcune funzioni sociali dell'agricoltura che giustificano gli interventi pubblici di sostegno al settore e che prevedono al contempo un allargamento delle attività accessibili al primario, grazie alle attività connesse, con la crescita delle opportunità di reddito per l'imprenditore agricolo (5, 17).

Per molte aziende agricole queste opportunità potrebbero rappresentare una via di sbocco alla precarietà e assicurare la permanenza sul territorio di addetti agricoli e di popolazione, specialmente nelle aree difficili della montagna e della collina. Ciò potrebbe contribuire a ridurre il processo in corso di dissesto del territorio, con vantaggi anche per le popolazioni della pianura.

Spetta al "nuovo imprenditore agricolo" cogliere le nuove opportunità d'intrapresa e quindi di reddito che gli vengono offerte se vuole mantenere il passo con lo sviluppo.

2. La dinamica aziendale

Le trasformazioni che hanno interessato la nostra agricoltura negli ultimi decenni non trovano precedenti in altri periodi storici. Più che di evoluzione del settore agricolo si può parlare di rivoluzione, considerati i cambiamenti intervenuti in un lasso di tempo relativamente breve (24).

Secondo l'ultimo Censimento Generale dell'Agricoltura (2000) le imprese agricole in Italia erano quasi 2,6 milioni di unità. In realtà quelle che hanno richiesto il numero di partita IVA erano poco più di un milione. La maggior parte delle aziende agricole italiane pertanto non commercializzano la loro produzione e sono dedite all'autoconsumo, sempre che la produzione sia presente (14). Se al numero delle aziende con partita IVA togliamo quelle in regime di esonero rimangono poche centinaia di migliaia di aziende che sono veramente mercantili.

Da un'indagine campionaria dell'ISTAT condotta nel 2003 le aziende agricole italiane si sono ridotte a circa 2,2 milioni di unità, con una diminuzione di circa il 13% rispetto al totale delle aziende censite nel 2000. Le aziende agricole con attività multifunzionali, intese come quelle attività diverse dalle tradizionali di coltivazione ed allevamento e che rientrano tra le attività connesse, rappresentano il 5% del totale delle aziende rilevate (circa 110.000 unità), di cui il 33% si colloca nel Nord, il 15% al centro e il 52% nel Mezzogiorno. Il processo di riduzione delle aziende è destinato a continuare, non solo per l'espulsione delle unità più piccole, ma anche per l'espulsione delle aziende che non sono da considerare tali. In definitiva la maggioranza numerica delle aziende agricole italiane sono part-time, di ridotte dimensioni e con basso volume d'affari (18, 25).

Si sente parlare in questi anni di un ritorno di addetti all'attività agricola, in realtà si tratta di un fenomeno limitato ma che si può allargare in relazione alle opportunità legate ai vantaggi dell'essere riconosciuti imprenditori agricoli. È il caso del riconoscimento dei "titoli" per l'accesso al regime di pagamento unico previsto dalla riforma della PAC. Recentemente l'Agea (Agenzia per le erogazioni in agricoltura) ha comunicato i "titoli provvisori" a tutti i beneficiari per l'accesso al regime di pagamento unico, salvo la verifica dei requisiti richiesti, tra i quali il possesso del numero di partita IVA. Molti beneficiari sono produttori orientati all'autoconsumo familiare. Per continuare a beneficiare del contributo alcuni di questi saranno incoraggiati ad aprire la partita IVA, grazie alle sollecitazioni ed all'assistenza delle OO. PP. AA.

Non ci dobbiamo meravigliare se il numero delle imprese agricole italiane dovesse aumentare nel corso del 2006, in conseguenza della riforma della PAC, con una proliferazione di partite IVA. In definitiva le aziende agricole con la partita IVA e che effettivamente commercializzano i loro prodotti sul mercato saranno di molto inferiori a quelle censite, se teniamo conto delle seguenti condizioni:

- apertura di nuove partite IVA in funzione della riforma della PAC, per continuare a percepire, sino al 2013, gli aiuti comunitari come per il passato;
- mancata chiusura di vecchie partite IVA non più attive;
- tenuta di partite IVA agricole in funzione dei benefici urbanistici (diritto di costruzione in terreno agricolo, esonero dagli oneri di urbanizzazione, esclusione dalla imposizione fiscale dei fabbricati rurali ecc.);
- sdoppiamento delle partite IVA a livello di imprese familiari per abbassare il volume d'affari e rientrare nel regime di esonero;
- sdoppiamento delle partite IVA nei contratti associativi (mezzadria, soccida, compartecipazione ecc.);
- mantenimento della partita IVA da parte dei proprietari che concedono in affitto precario la terra per sfuggire ai vincoli della legge sull'affitto.

3. Il dualismo delle aziende

Dagli anni '60 in poi la nostra agricoltura ha subito notevoli cambiamenti che si possono sintetizzare nei seguenti aspetti principali:

- contrazione del numero delle aziende;
- contrazione del numero degli allevamenti in forma ancora più marcata;
- contrazione degli addetti;
- riduzione della terra coltivata, a causa dell'abbandono delle aree meno fertili ed all'utilizzo urbanistico del territorio;
- specializzazione produttiva, sino ad arrivare alla monocoltura ed ai centri di produttività;
- intensificazione produttiva della terra e degli allevamenti, grazie alla selezione genetica e ai risultati della ricerca nella cura delle produzioni;
- industrializzazione dell'agricoltura, sia a livello tecnico con condizionamento ambientale, sia a livello economico con il ricorso al credito.

Il nuovo assetto dell'agricoltura vede l'affermarsi da una parte di poche aziende di grande dimensione altamente specializzate e dall'altra il proliferare delle aziende di piccole e piccolissime dimensioni sempre più precarie.

Il risultato di questa contrapposizione ha portato all'affermarsi di un dualismo nella nostra agricoltura, con i due estremi che tendono ad allontanarsi. La differenziazione aziendale legata al dualismo può essere rappresentata efficacemente dal livello di occupazione della famiglia:

- imprese full-time;
- imprese part-time.

Nel primo caso la famiglia attinge al reddito aziendale per tutte le proprie esigenze, nel secondo caso il reddito aziendale non è sufficiente ai fabbisogni ed è necessario cercare una integrazione in attività extragricole da parte dei componenti della famiglia agricola, dando origine alle aziende pluriattive.

A loro volta le aziende full-time possono comprendere le aziende che si sono sviluppate sulle attività specificatamente agricole ed aziende multifunzionali, che ai nostri fini sarebbe meglio definire multisettoriali, che accanto all'attività agricola tradizionale vera e propria hanno sviluppato le attività connesse con diversificazione degli impegni per coprire tutta la potenzialità lavorativa della famiglia. In ogni caso per ambedue le tipologie aziendali la fonte del reddito della famiglia è quella dell'impresa agricola (17).

Si possono anche quantificare numericamente queste aziende. Secondo i dati riferiti al Censimento Generale dell'Agricoltura del 2000, le aziende agricole possono essere suddivise in "aziende non-imprese", quelle al di sotto delle 8 UDE, e "aziende-imprese" quelle con UDE superiore ad 8 (25). Dall'analisi dei risultati emerge che più di quattro aziende censite su cinque appartengono alla prima categoria, tradotto in percentuale si tratta dell'82,8% di "aziende non-imprese" e del 17,2% di "aziende-imprese".

Ulteriori conferme a questi rapporti ci vengono da uno studio sulle strategie aziendali, individuate sempre sui dati del Censimento del 2000. In questo caso le aziende mercantili, classificate secondo i RLS aziendali superiori a 20.000 euro,

sarebbero 310.655 unità, pari al 12,8% (23).

I risultati delle varie indagini tendono a convergere e confermano il crescente dualismo dell'agricoltura italiana.

Agli estremi delle due tipologie aziendali possiamo osservare da una parte le aziende senza terra, è il caso degli allevamenti intensivi, come quelli avicoli, suinicoli ecc. e dall'altra parte le aziende con sola terra, sono le aziende cosiddette destrutturate che hanno perso tutti i capitali e la manodopera e si affidano completamente ai contoterzisti per tutte le operazioni colturali dell'azienda.

Figura 1: Il dualismo delle aziende agricole

<i>Occupazione</i>	AZIENDE		<i>Occupazione</i>
<i>Full-time</i>	Sviluppate	Precarie	<i>Part-time</i>
	Multisetoriali		

In realtà nel prossimo futuro è possibile annoverare un'altra tipologia aziendale, in funzione della recente riforma della PAC, sono le aziende che Jan Douwe Van Der Ploeg definisce "virtuali" (19, 20) in quanto non si prefiggono alcuna attività produttiva e il loro bilancio è rappresentato dai titoli assegnati con il pagamento unico degli aiuti comunitari sino al 2013 (15).

4. La riforma della Politica Agricola Comunitaria (PAC)

4.1 Premessa

L'attività agricola nei paesi sviluppati è sempre più condizionata dall'intervento pubblico, che interferisce sulle scelte imprenditoriali anche in un'economia di mercato. Nell'Unione Europea l'intervento pubblico in agricoltura è regolato dalla Politica Agricola Comunitaria (10).

La Politica Agricola Comunitaria nasce con la Comunità stessa. I suoi obiettivi sono definiti all'articolo 39 del trattato di Roma del 1957. La politica agricola viene quindi definita non più a livello nazionale, ma dettata dagli organismi comunitari attraverso Direttive e Regolamenti. L'instaurazione del mercato comune e lo sviluppo armonioso delle attività economiche hanno determinato un crescente interesse per il controllo e lo sviluppo dell'attività agricola considerata strategica per il perseguimento degli obiettivi comunitari, settore di punta nel processo d'integrazione europea.

Gli obiettivi dichiarati erano il sostegno del reddito degli agricoltori, l'aumento della produzione e della produttività, con conseguente maggior sicurezza negli approvvigionamenti e la stabilità nei prezzi di mercato.

Gli strumenti per raggiungere gli obiettivi sopra esposti sono stati una politica protezionistica di controllo del mercato, prezzi minimi garantiti, tariffe sulle importazioni e restituzioni sulle esportazioni.

Nel 1962, per finanziare la PAC, nasce il Fondo Europeo Agricolo di Orientamento e Garanzia (FEOGA). Nel corso degli anni Sessanta il sostegno ai prezzi viene progressivamente esteso ad un numero crescente di prodotti, dai cereali al latte, alla carne, interessando quasi il 75% dei finanziamenti agricoli della Comunità.

Gli interventi strutturali a favore delle imprese agricole, previsti dall'articolo 39 del trattato di Roma fecero invece fatica a decollare. Infatti, le risorse ad essi destinate non hanno mai superato il 5% dei finanziamenti complessivi della PAC. Anche le indicazioni e le raccomandazioni sulla necessità di politiche strutturali in agricoltura della Conferenza intergovernativa di Stresa del 1959 non portarono maggiori investimenti in questo senso (3).

Le prime politiche strutturali furono tese a rafforzare le aziende agricole attraverso finanziamenti che consentissero lo sviluppo e l'applicazione delle nuove e moderne tecnologie produttive, al fine di ottenere maggiori quantità di prodotti.

La politica di sostegno dei prezzi determinò negli anni degli squilibri tra settori e contenziosi tra paesi membri, in relazione soprattutto ad un sostegno eccessivo che portò ad avere eccedenze di produzione. Nel frattempo la CEE da importatrice era diventata esportatrice per molti prodotti e le relative restituzioni cominciavano a pesare non poco sulle casse comunitarie. Inoltre iniziavano a farsi sentire anche le pressioni dei mercati internazionali che giudicavano troppo protezionistica la politica messa in atto dalla Comunità.

La riforma degli anni '80 attua una strategia riduttiva con l'istituzione di quote di produzione, set-aside, tasse di corresponsabilità. È di questi anni, ad esempio, l'applicazione del regime delle quote latte per il settore lattiero-caseario. In Italia la sua introduzione verrà ritardata e si arriverà alle conseguenze che sono state in questi anni sotto gli occhi di tutti. Ancora oggi esistono situazioni produttive non regolarizzate.

Nel 1992 viene invece introdotta la cosiddetta riforma Mac Sharry che porta a modifiche importanti introducendo un principio nuovo e spostando il sostegno all'attività agricola dagli incentivi sui prezzi dei prodotti a contributi erogati sulla base delle superfici coltivate. Si delineano i due obiettivi principali che guideranno la Politica Agricola Comunitaria fino ad oggi, quello della riduzione delle quantità di prodotti ottenuti, per non accrescere eccessivamente le scorte a livello comunitario, e quello della tutela dell'ambiente: il primo da raggiungersi disincentivando la produttività attraverso il sostegno per ettaro, il secondo perseguibile in parte attraverso il minore utilizzo di mezzi produttivi (concimi chimici, antiparassitari) ed in parte grazie all'introduzione di tecniche di coltivazione meno intensive, come quelle biologiche.

Per venire ai giorni nostri, nel 2003 il Consiglio agricolo europeo ha approvato la cosiddetta riforma di medio termine della PAC. Questa riforma, così chiamata perché doveva essere un aggiustamento di metà percorso di Agenda 2000, è stata invece molto incisiva e apporta cambiamenti radicali al sistema di sostegno del settore agricolo.

Viene istituito il Pagamento Unico per Azienda (PUA), disaccoppiato dalla produzione e vincolato al rispetto di norme ambientali e di benessere animale (la cosiddetta *condizionalità*). Le motivazioni di questi cambiamenti sono:

- riequilibrare il sostegno agricolo tra misure di mercato (*primo pilastro*) e misure di sviluppo rurale (*secondo pilastro*);
- svincolare (*disaccoppiare*) il sostegno dalla produzione stimolando gli imprenditori ad effettuare le proprie scelte sulla base dell'andamento di mercato e al tempo stesso utilizzare tipologie di sostegno maggiormente compatibili con le regole del commercio internazionale (Wto);
- incentivare le produzioni di qualità come chiede il consumo moderno;
- rendere compatibile il quadro finanziario comunitario con l'allargamento ad Est.

4.2 Il disaccoppiamento

Il disaccoppiamento degli aiuti consiste in un pagamento unico per azienda, indipendente dalla produzione. In particolare disaccoppiare significa separare l'aiuto comunitario dalla quantità e dal tipo di produzione. L'obiettivo è passare dal sostegno differenziato per prodotto ad un unico pagamento vincolato semplicemente alla coltivazione del terreno lasciando la possibilità alle aziende di scegliere le produzioni in funzione delle richieste del mercato. Il sostegno non sarà più legato alla coltivazione o all'allevamento di una particolare specie vegetale o animale ma verrà calcolato sulla base dei premi ricevuti dall'azienda nel triennio di riferimento 2000-2002 (21).

I beneficiari del Pagamento Unico Aziendale potranno dunque essere:

- gli agricoltori che abbiano beneficiato degli aiuti comunitari nel triennio 2000-2002;
- gli agricoltori che hanno ereditato un'azienda o parte di un'azienda da un imprenditore agricolo avente dei diritti;
- gli agricoltori che abbiano fatto domanda alla riserva nazionale.

Inoltre, la condizione per poter presentare domanda di attribuzione dei diritti è la dimensione aziendale che non può essere inferiore a 0,30 ettari.

La fissazione dei titoli è avvenuta da parte di Agea che ha provveduto a comunicare in maniera provvisoria il numero dei titoli ed il loro valore ad ogni singolo intestatario entro il 15 aprile 2005. Entro il 16 maggio successivo gli agricoltori, dopo aver verificato la corrispondenza dei titoli loro assegnati con i documenti in proprio possesso, hanno presentato la domanda di fissazione definitiva dei titoli. Ogni anno successivo l'agricoltore sarà tenuto a richiedere il Pagamento Unico Aziendale abbinando ogni singolo titolo posseduto ad un ettaro coltivato. Viene così ad attuarsi il disaccoppiamento in quanto l'azienda sarà tenuta esclusivamente alla coltivazione della superficie corrispondente ai titoli posseduti, fatti salvi i vincoli ambientali e di rispetto del benessere animale posti dalla condizionalità, senza avere altri obblighi sulla scelta delle colture da effettuare.

È prevista la facoltà per gli Stati membri di costituire una Riserva nazionale, finanziata attraverso una riduzione lineare degli importi di riferimento al massimo del 3%. La Riserva nazionale può essere utilizzata per attribuire importi di riferimento ad agricoltori che hanno iniziato l'attività dopo il 2002 e che sarebbero esclusi dal pagamento unico o ad agricoltori che si trovavano in condizioni particolari durante il triennio di riferimento.

4.3 La condizionalità

In primo luogo occorre ricordare che l'erogazione dei pagamenti diretti è subordinata al rispetto di due gruppi di norme. Il primo comprende un insieme di direttive (allegato III del Regolamento (CE) 1782/03), intese a tutelare la sanità pubblica, la salute delle piante e degli animali, l'ambiente, cui il nostro Paese deve dare graduale attuazione. Il secondo gruppo è relativo alle buone condizioni agronomiche e ambientali: in questo caso il Regolamento, nell'allegato IV, individua gli obiettivi (combattere l'erosione del suolo, mantenere la sostanza organica, mantenere la struttura del suolo, assicurare livelli minimi di mantenimento) e lascia facoltà agli Stati membri di definire le modalità attuative (ad es. copertura minima del suolo, eventuali norme di rotazione, uso delle macchine, protezione dei pascoli). I requisiti possono essere definiti a livello di Stato o di regione. Il Regolamento (CE) 796/04 riporta le modalità applicative della condizionalità e il relativo sistema di controllo, mentre il Decreto del Ministro delle Politiche Agricole e Forestali del 13 dicembre 2004 ha emanato le disposizioni specifiche per l'applicazione della condizionalità in Italia a partire dal 2005. L'Allegato 2 del Decreto, che recepisce l'articolo 5 del Regolamento (CE) 1782/03, stabilisce le Buone Condizioni Agronomiche e Ambientali (BCAA) fissando le "Norme" per garantire il raggiungimento degli obiettivi fissati dall'Unione Europea.

4.4 Modulazione e sviluppo rurale

Uno degli obiettivi della revisione di medio termine della Politica Agricola Comunitaria è incrementare le risorse per le politiche di sviluppo rurale, grazie allo spostamento di fondi (derivanti dalla modulazione) dal I al II pilastro della PAC. Tali risorse saranno destinate a promuovere il miglioramento della qualità dei prodotti, ad aiutare i produttori ad adeguarsi alle nuove norme ambientali e ai nuovi requisiti per il benessere animale, a promuovere la consulenza aziendale (10, 12).

Il Regolamento (CE) 1783/03 integra e modifica il Regolamento (CE) 1257/99 apportando alcune novità e alcune modificazioni a misure già esistenti:

- *Rispetto delle norme e adeguamento agli standards.*

L'obiettivo è promuovere una rapida applicazione delle normative comunitarie in materia di ambiente, sanità pubblica, salute delle piante e degli animali, benessere degli animali e sicurezza sul lavoro. Tali norme provocheranno costi aggiuntivi e conseguenti perdite di reddito per le aziende agricole; per questo motivo è stata predisposta una misura atta a garantire un sostegno per la copertura parziale dei costi di adeguamento.

- *Sostegno alle aziende per usufruire dei servizi di consulenza.*

La revisione di medio termine della PAC introduce per gli Stati Membri l'obbligo di istituzione, a partire dal 1 gennaio 2007, di un sistema di consulenza aziendale finalizzato a facilitare l'applicazione dei criteri di gestione obbligatori, cui si faceva riferimento a proposito della condizionalità. Il contributo viene erogato alle aziende che aderiscono al sistema di consulenza.

- *Qualità alimentare.*

La nuova misura sulla qualità degli alimenti ha lo scopo di garantire i consumatori attraverso l'inserimento delle aziende in sistemi di qualità comunitari o nazionali e al tempo stesso di creare valore aggiunto per le produzioni. Il sostegno viene accordato alle aziende che aderiscono volontariamente ai metodi di produzione definiti dai Regg. (CEE) 2081/92 (DOP e IGP), 2092/91 (prodotti biologici) e Regolamento (CE) 1493/99 (mercato vinicolo). Tali incentivi sono versati annualmente per un periodo massimo di cinque anni e per un importo massimo annuo di 3.000 euro per azienda. Sono inoltre previsti incentivi per le associazioni di produttori per attività di informazione dei consumatori e di promozione dei prodotti.

- Benessere degli animali.

È prevista anche la copertura delle spese sostenute per il benessere degli animali. Si tratta di sovvenzioni a favore degli agricoltori che si impegnano, per un periodo di almeno cinque anni, a migliorare il benessere degli animali in maniera più incisiva rispetto alle regole per il benessere animale già applicate. L'aiuto annuale sarà calcolato sulla base delle eventuali maggiori spese sostenute per tali tecniche di allevamento, ma non potrà comunque superare 500 euro annui per capo allevato.

- Giovani agricoltori.

Relativamente ai giovani agricoltori, categoria ritenuta essenziale nello sviluppo delle zone rurali, la riforma apporta alcune novità riguardanti il premio per l'insediamento e la percentuale di finanziamento della misura di aiuto agli investimenti aziendali. Il premio di primo insediamento rimane a 25.000 Euro, elevabili a 30.000 Euro per i giovani agricoltori che si avvalgono del sistema di consulenza aziendale. Il Regolamento (CE) 1783/03 aumenta anche la percentuale di aiuto all'investimento erogato dalla UE ai giovani agricoltori (dal 45% al 50% nelle zone normali e dal 55% al 60% in quelle svantaggiate).

4.5 La multifunzionalità

Il ruolo multifunzionale dell'agricoltura è ormai ampiamente riconosciuto. L'azienda agricola non viene vista solo come realtà meramente produttiva, ma come anello importante per l'equilibrio ecologico, la salvaguardia ambientale, la qualità e la sicurezza degli alimenti. L'OCSE nel 1998 dà una definizione di multifunzionalità che può ritenersi abbastanza completa: "Oltre alla produzione di alimenti e fibre (sani e di qualità) l'agricoltura può modificare il paesaggio, contribuire alla gestione sostenibile delle risorse, alla preservazione della biodiversità, a mantenere la vitalità economica e sociale delle aree rurali" (16). Questo nuovo ruolo dell'agricoltura è progressivamente aumentato di importanza nelle società sviluppate dell'Occidente, a motivo delle trasformazioni sociali ed economiche degli ultimi decenni e della rete di aziende agricole diffuse su tutto il territorio (26).

Pampanini (17) esamina la differenza tra la multifunzionalità del settore agricolo, definita come la capacità di produrre beni materiali e immateriali (paesaggio, manutenzione del territorio, salvaguardia idrogeologica) e la multisettorialità, ovvero la capacità dell'impresa agricola di svolgere altre attività (agriturismo, fattorie didattiche, ecc.) al fine di aumentare il reddito netto dell'imprenditore. Differente è ancora il concetto di pluriattività: lo svolgimento di lavori extraaziendali anche non agricoli

da parte dell'imprenditore e dei membri della sua famiglia che dedicano solo parte del loro tempo all'attività primaria. Queste tre diverse definizioni apparentemente simili, in realtà differenti, sono il segno di un'attività agricola che è mutata e muta continuamente, inducendo forti adattamenti della classe imprenditoriale agricola.

Significativo è il ruolo multifunzionale dell'agricoltura, ovvero la capacità di produrre contemporaneamente produzioni agricole e benefici per l'ambiente (conservazione del paesaggio, salvaguardia idrogeologica), a vantaggio dell'intera collettività; sono le cosiddette esternalità positive dell'agricoltura che giustificano gli aiuti economici della Comunità nei confronti degli operatori del settore agricolo.

Uno dei primi interventi comunitari legislativi sulla multifunzionalità si ha a metà degli anni '80, tramite il Regolamento (CEE) 797/85 che ha un'applicazione molto vasta e comincia a parlare di integrazione tra agricoltura intensiva ed equilibrio ecologico, di tutela del paesaggio, di funzione ambientale degli agricoltori e quindi di una loro eventuale remunerazione (8). Due anni più tardi viene emanato il Regolamento (CEE) 1760/87 che mira a ridurre le cosiddette esternalità negative prodotte dall'agricoltura attraverso la riduzione delle attività: riposo rotazionale, rimboschimento, utilizzo dei terreni per scopi non agricoli. Ma per registrare un intervento ancora più deciso per il perseguimento degli obiettivi ambientali, occorre arrivare alla riforma PAC del 1992, con l'adozione del Regolamento (CEE) 2078/92 che porta misure per la riduzione degli inquinanti, l'utilizzo di tecniche a basso impatto ambientale e la realizzazione di opere di gestione e manutenzione delle risorse naturali. Questo Regolamento si rivolge a tutti gli agricoltori che si impegnino a proteggere e migliorare l'ambiente rinunciando a tecniche di produzione intensiva. I premi per l'agricoltore sono calcolati sulla base dei maggiori costi o dei minori redditi derivanti dall'applicazioni dei vincoli ambientali.

Altro Regolamento (CEE), emanato sempre nel 1992, è il numero 2080/92 che interviene sul settore forestale, incentivando il rimboschimento (a fini produttivi o naturalistici) e la cura ed il miglioramento dei boschi già esistenti. Grazie a questi aiuti nell'intero territorio dell'Unione europea 1 milione di ettari di terreni agricoli sono stati investiti a bosco.

Con Agenda 2000 si comincia a parlare di ecocondizionalità, quindi della possibilità per i paesi membri di subordinare i pagamenti pubblici a comportamenti corretti dal punto di vista ambientale. Ma è solo con l'introduzione della riforma di medio termine della PAC del 2003 che la condizionalità diventa vincolante per la percezione dei contributi disaccoppiati.

Le norme sulla ecocondizionalità contribuiscono ad amplificare le cosiddette esternalità positive. Infatti, l'aver subordinato il PUA al rispetto delle norme ambientali e di tutela del territorio e a quelle riguardanti il benessere degli animali avrà sicuramente un effetto positivo sulla sostenibilità delle attività agricole. Tali norme, inoltre, rafforzano la fiducia dei consumatori nei confronti dell'attività agricola, ma soprattutto aiutano il cittadino a comprendere e quindi giustificare l'utilizzo di risorse pubbliche per il sostegno dell'agricoltura. Dall'altra parte però il disaccoppiamento potrebbe avere anche effetti negativi o comunque riduttivi delle esternalità positive apportate alla collettività. Infatti si potrebbe assistere, in alcune circostanze, a dismissioni di attività produttive, pur mantenendo un'attività minima di lavorazione dei

suoli (per garantirsi il pagamento dell'aiuto disaccoppiato). Questo potrebbe essere vero soprattutto per quei conduttori più anziani che vedrebbero assicurata una buona redditività a fronte di servizi ambientali resi piuttosto scarsi. Parallelamente per le aziende zootecniche potrebbe invece realizzarsi la situazione di abbandono dell'attività di produzione di latte, in quanto la sola coltivazione degli ettari corrispondenti ai diritti acquisiti nel 2006 col disaccoppiamento del settore lattiero caseario, può consentire il percepimento di un aiuto importante (a partire da 3,3 euro al quintale di latte prodotto fino al 2013) senza di fatto dover necessariamente continuare a produrre latte.

5. Interventi legislativi nazionali

5.1 Estensione delle competenze per il settore agricolo

A livello nazionale il legislatore si è occupato delle tematiche relative al nuovo assetto istituzionale del settore agricolo, per adeguarlo ai nuovi orientamenti della Politica Agricola Comunitaria e al nuovo diritto comunitario della politica stessa secondo le più recenti formulazioni (11,13).

La normativa nazionale prende le mosse dalla Legge n. 57/2001, alla quale hanno fatto seguito i decreti legislativi di attuazione; altre normative sono in corso di emanazione, per cui si può parlare di un cantiere legislativo in corso.

Gli aspetti più innovativi per il settore primario sono contenuti nel Decreto legislativo n. 228/2001 avente per oggetto "Orientamenti e modernizzazione del settore agricolo..." dove all'art. 1 si apportano profonde modifiche all'art. 2135 del Codice civile relativo alle competenze dell'imprenditore agricolo per il prossimo futuro.

Il nuovo testo dell'art. 2135 del Codice civile è il seguente:

"È imprenditore agricolo chi esercita una delle seguenti attività: coltivazione del fondo, selvicoltura, allevamento di animali e attività connesse.

Per coltivazione del fondo, per selvicoltura e per allevamento di animali si intendono le attività dirette alla cura ed allo sviluppo di un ciclo biologico o di una fase necessaria del ciclo stesso, di carattere vegetale o animale, che utilizzano o possono utilizzare il fondo, il bosco o le acque dolci, salmastre o marine.

Si intendono comunque connesse le attività, esercitate dal medesimo imprenditore agricolo, dirette alla manipolazione, conservazione, trasformazione, commercializzazione e valorizzazione che abbiano ad oggetto prodotti ottenuti prevalentemente dalla coltivazione del fondo o del bosco o dall'allevamento di animali, nonché le attività dirette alla fornitura di beni o servizi mediante l'utilizzazione prevalente di attrezzature o risorse dell'azienda normalmente impiegate nell'attività agricola esercitata, ivi comprese le attività di valorizzazione del territorio e del patrimonio rurale e forestale, ovvero di ricezione ed ospitalità come definite dalla legge".

Tabella 1: Caratteri differenziali dei compiti assegnati all'imprenditore agricolo secondo la vecchia e la nuova versione dell'art. 2135 del Codice civile.

Ordine	VECCHIA (1942)	NUOVA (2001)
1.	Definizione	
1.1	Coltivazione del fondo	Coltivazione del fondo
1.2	Selvicoltura	Selvicoltura
1.3	Allevamento del bestiame (<i>grossi animali</i>)	Allevamento di animali (<i>tutti</i>)
1.4	Attività connesse all'esercizio normale dell'agricoltura	Attività connesse
2.	Specifica dei punti 1.1, 1.2, 1.3	
2.1		Ciclo biologico o di una fase (<i>vegetale o animale</i>)
2.2		Che utilizzano o possono utilizzare: - il fondo - il bosco - le acque dolci - le acque salmastre - le acque marine
3.	Specifica del punto 1.4 (<i>attività connesse</i>)	
3.1	Trasformazione dei prodotti agricoli	Prodotti ottenuti prevalentemente di cui al punto 1: - manipolazione - conservazione - trasformazione - commercializzazione - valorizzazione
3.2	Alienazione dei prodotti agricoli	Beni o servizi con utilizzo prevalente di attrezzature e risorse aziendali: - valorizzazione del territorio - valorizzazione del patrimonio rurale - valorizzazione del patrimonio forestale - ricezione ed ospitalità

Per meglio comprendere le innovazioni che sono state introdotte dal legislatore, abbiamo messo a confronto la vecchia e la nuova versione dell'articolo stesso.

Nel primo paragrafo notiamo subito due differenze sostanziali tra la vecchia versione dell'art. 2135 e la nuova:

- la prima riguarda gli allevamenti, con la restrizione al "bestiame" nella vecchia versione e con estensione a tutti gli "animali" nella nuova. La differenza è sostanziale perché con la nuova versione si presuppone che rientrino nell'attività

agricola l'allevamento di qualsiasi animale, sempre in presenza di un'impresa che possieda il terreno sufficiente a produrre almeno un quarto dell'alimento necessario, estendendo ulteriormente le competenze del settore agricolo (cani ecc.);

- la seconda riguarda le attività connesse, con la restrizione nella vecchia versione "all'esercizio normale dell'agricoltura" e lasciando invece aperte ampie possibilità nella nuova, come più chiaramente specificato successivamente.

Nel secondo paragrafo sono indicate alcune specifiche relative ai primi tre punti, nella sola versione recente, che mettono in evidenza ulteriori differenziazioni nelle produzioni vegetali o animali per le quali l'imprenditore agricolo può occuparsi dell'intero ciclo biologico o limitare il proprio intervento solo ad una fase del ciclo stesso. Nel comparto vegetale vi è l'esempio della produzione delle sole piantine da trapiantare, come per il pomodoro. Nel comparto animale l'attività di allevamento limitata al solo svezzamento, come per i vitelli da ingrasso. Queste attività utilizzano o possono utilizzare come sede il fondo, il bosco e le acque dolci, salmastre o marine. La dicitura "possono utilizzare" può indurre a qualche perplessità e a problemi di gestione e di interpretazione delle attività perchè l'utilizzo degli strumenti indicati può non essere vincolante, come nel caso dell'allevamento di polli, di cani, degli allevamenti ittici, della produzione di funghi ecc. La parte più innovativa della nuova versione dell'art. 2135 del Codice civile è comunque quella che riguarda le specifiche relative alle attività connesse, limitative nella vecchia versione e molto estensive nella nuova, sulle quali soffermiamo la nostra attenzione. Innanzitutto queste attività si riferiscono a prodotti ottenuti "prevalentemente", cioè oltre il 50%, in azienda, aprendo la possibilità di accesso per la rimanente quota a prodotti di origine extraaziendale, senza con questo compromettere il requisito di attività agricola. In pratica vi è la possibilità di raddoppiare il volume d'affari dell'azienda con la stessa dimensione fisica di partenza, grazie ai successivi processi di manipolazione, conservazione, trasformazione, commercializzazione e valorizzazione delle produzioni aziendali con quelle reperibili sul mercato. Ma la novità più importante della modifica legislativa è quella che si riferisce alla fornitura di beni o servizi con utilizzo prevalente di attrezzature e risorse aziendali. Per oltre il 50% bisogna fare affidamento alle risorse aziendali, ma per la quota rimanente è possibile accedere anche a risorse extraaziendali che consentono un ulteriore ampliamento delle capacità produttive dell'azienda.

Inoltre si introduce la voce "servizi" che rappresentano la vera novità per il settore agricolo, notoriamente legato al campo dei beni alimentari e non. Alla produzione di beni si accompagna la prestazione di servizi che trovano una ulteriore specifica nelle seguenti competenze:

- valorizzazione del territorio;
- valorizzazione del patrimonio rurale;
- valorizzazione del patrimonio forestale;
- ricezione ed ospitalità (comprese le attività ricreative, culturali, didattiche, sportive, escursionistiche, ippoturismo ecc.).

Tra le attività connesse riveste un ruolo molto importante l'agriturismo che trova pieno riconoscimento come attività agricola e che porterà a consolidare le iniziative in corso e a promuoverne delle nuove. L'allargamento del campo delle attività connesse fornisce agli imprenditori agricoli nuove opportunità d'impresa le cui

potenzialità sono ancora tutte da verificare in relazione alle incertezze interpretative delle norme e in relazione anche alle imposizioni fiscali e contributive collegate. Attualmente le attività connesse riconosciute e che rientrano nel reddito agrario sono 12, come risulta dal prospetto seguente (7). Nuovi chiarimenti sono in corso da parte dell'Agenzia delle Entrate, per affrontare la casistica che di volta in volta viene sottoposta alla Sua attenzione da parte degli operatori, alla ricerca della certezza nella interpretazione delle norme. Tra i chiarimenti per le attività connesse si ricorda che l'orientamento dell'Agenzia delle Entrate è quello di fare riferimento al principio della "usualità", nel senso che le attività di trasformazione e di manipolazione dei prodotti devono essere usualmente esercitate nell'ambito dell'attività agricola. Ma non sempre le interpretazioni sono univoche da parte delle Agenzie Regionali, lasciando spazio all'incertezza e alle controversie interpretative.

Tabella 2: Attività connesse rientranti nel reddito agrario.

Ordine	Descrizione delle attività connesse	Codici*
1	Produzione di carni e prodotti della loro lavorazione (escluse carni affumicate e salumi)	15.11.0 15.12.0
2	Lavorazione e conservazione delle patate (escluso puré e patate fritte)	15.31.0
3	Produzione di succhi di frutta e ortaggi	15.32.0
4	Lavorazione e conservazione di frutta e ortaggi	15.33.0
5	Produzione di olio d'oliva e di semi oleosi	01.13.2 15.41.1 15.41.2
6	Produzione di olio di semi di granoturco	Ex 15.62.0
7	Trattamento igienico del latte e produzione di derivati del latte	01.21.0 01.22.1 15.51.1 15.51.2
8	Lavorazione delle granaglie	Da 15.61.1 a 15.61.3
9	Produzione di vini	01.13.1 15.93.1 15.93.2
10	Produzione di aceto	Ex 15.87.0
11	Produzione di sidro e altre bevande fermentate	Ex 15.94.0
12	Manipolazione di prodotti derivati dalla coltivazione	01.11 01.12 01.13

* Classificazione delle attività economiche Atecofin 2004, utilizzata anche dall'Istat.

In ogni caso è stato confermato che rientrano tra le attività connesse la produzione di energia (calorica ed elettrica) ottenuta con i pannelli solari e da biomasse.

Per i beni esclusi, ma comunque ottenuti nell'ambito delle attività connesse, sono previste delle agevolazioni fiscali sull'IVA e sull'IRPEF, con l'applicazione di un regime forfetario. Rientrano nel reddito agrario anche le attività connesse relative agli acquisti di prodotti, nel rispetto della prevalenza per quelli prodotti in azienda.

Anche i capi allevati in eccedenza rispetto alle capacità produttive del fondo, e per i quali è stata operata l'imposizione IRPEF forfetaria per la fase di allevamento, rientrano nel reddito agrario se fanno parte delle attività connesse.

Le attività connesse consentono quindi di allargare notevolmente il volume d'affari delle aziende, mantenendo invariata la dimensione fisica di partenza. Gran parte delle attività connesse erano in passato precluse al settore agricolo e pertanto necessitano anche di nuove professionalità e competenze, che l'imprenditore agricolo deve spesso acquisire, pena la subordinazione agli imprenditori di origine extragrnicola, che già operano nelle attività che in passato erano escluse dalla attività agricola.

Pertanto anche la gestione dell'impresa si dovrà uniformare ai modelli commerciali ed industriali dei quali assume parte delle competenze. Si tratta di mettere in atto una gestione amministrativa moderna e prenderà sempre più corpo nell'azienda agraria la componente "organizzazione", in analogia con quanto avviene nel campo commerciale ed industriale (business plan ecc.).

Anche gli studi economico-agrari si dovranno adeguare alle nuove esigenze con lo spostamento dell'analisi dalle funzioni produttive, che considerano l'azienda come unità tecnica (Farm Management), a quelle organizzative, commerciali e finanziarie delle imprese industriali (Agricultural Production Economics).

5.2 Ulteriori considerazioni

Le modifiche legislative rivestono notevole rilevanza per il settore agricolo, anche se non siamo ancora in condizione di recepire completamente la complessità dei contenuti trovandoci nella fase transitoria di applicazione e di interpretazione delle norme, per le modifiche legislative ancora in corso che riguardano altri comparti che verranno coinvolti in itinere. Resta comunque il rischio di rendere incerti i confini tra le attività agricole e quelle commerciali e richiamare i commercianti nel settore agricolo, in particolare nel campo della ristorazione, del contoterzismo ecc. (27).

Basti pensare ai riflessi sulla normativa fiscale, su quella previdenziale, creditizia, urbanistica ecc. per le quali sono necessari ulteriori adeguamenti.

Un primo risultato pratico che si rileva nel settore agricolo, in conseguenza delle nuove normative che lasciano dei confini ancora incerti tra attività agricole e commerciali, è l'ingresso nel settore primario di imprenditori extragrnicoli che dispongono delle capacità tecniche e professionali per esercitare le nuove attività, frutto dell'esperienza acquisita all'esterno, della disponibilità di capitali, come nella ristorazione, nel contoterzismo ecc.

Le nuove opportunità d'impresa sono legate principalmente all'estensione delle attività agricole dalla produzione di beni alla prestazione di servizi, che possono interessare le persone, la collettività e il territorio.

Anche per i giovani si aprono nuove prospettive, perché le attività proposte sono meno vincolanti alle strutture esistenti e più aperte alle innovazioni e a nuove funzioni imprenditoriali.

Se poi teniamo conto della possibilità di accedere anche a prodotti agricoli acquistati, nei limiti previsti, ci rendiamo conto dei nuovi spazi che si aprono per l'allargamento del budget per gli imprenditori agricoli che intendono approfittarne.

Un altro aspetto positivo per quanto riguarda i servizi è la sottrazione degli imprenditori agricoli alla condizione di *price-taker* tipica invece per le produzioni agricole. La possibilità di percorrere tutta la filiera, dalla produzione al consumo, porta ad accrescere progressivamente il valore aggiunto dei beni, in modo che i redditi di filiera rimangano in mano all'imprenditore agricolo.

Ampi spazi di manovra si presentano anche per le attività condotte in forma associata, per uscire dai limiti angusti dell'impresa singola ed arrivare ad una rete di aziende che sia in grado di assumere un ruolo trainante e propositivo del mondo agricolo nella gestione dell'ambiente rurale. I riflessi sui livelli occupazionali sono di tutto rilievo se consideriamo che le nuove attività sono ad alta intensità di lavoro e consentono la permanenza in azienda di più unità lavorative, sia familiari che salariate. In definitiva le nuove opportunità d'intrapresa nel settore agricolo possono rappresentare una soluzione per l'allargamento della dimensione economica, di fronte alla rigidità della maglia aziendale. Si prefigurano prospettive nuove per la permanenza nel settore agricolo di addetti nella consapevolezza di essere in grado di raggiungere un budget e quindi un reddito adeguato alle proprie aspettative. Se per le aziende precarie queste opportunità possono rappresentare un'ancora di salvezza per la sopravvivenza, non di meno possono rappresentare anche per le aziende full-time una ulteriore possibilità di sviluppo. Le iniziative in questa direzione si stanno moltiplicando, basti ricordare l'apertura crescente di caseifici aziendali, quando l'allevamento raggiunge adeguate dimensioni produttive, con il ritorno della fase di trasformazione in azienda e spesso anche della commercializzazione, con l'accorciamento della catena distributiva. Così ad esempio i caseifici del Comprensorio del formaggio Parmigiano-Reggiano, che sono in fase di rapida contrazione, negli ultimi anni hanno visto una inversione di tendenza con una crescita numerica dei caseifici aziendali, con un ritorno della fase di trasformazione in azienda per i produttori più grandi.

Tabella 3: Caseifici attivi nel comprensorio del Parmigiano-Reggiano.

Caseifici	ANNO				
	1990	1995	2000	2005	Variazione % 2005/1990
Artigianali	104	84	70	67	-35,6
Aziendali	51	44	52	78	+34,6
Sociali	705	524	460	347	-50,8
TOTALE	860	652	582	492	-42,8

Fonte: nostre elaborazioni su dati del CFPR.

La riduzione complessiva del numero dei caseifici in tre lustri è stata del 42,8%, passando da 860 unità del 1990 a 492 nel 2005. In pratica sono stati chiusi o accorpati ad altre strutture 23 caseifici all'anno.

In controtendenza alla riduzione dei caseifici cooperativi (-50,8%) e artigianali, (-35,6%) sono aumentati i caseifici annessi agli allevamenti, salendo da 51 unità del 1990 a 78 nel 2005 (+34,6%). In realtà negli anni '90 i caseifici aziendali avevano subito una contrazione, seguita da una rapida ripresa dal 2000 in poi.

Il fenomeno è strettamente collegato alla crescita dimensionale delle aziende da latte che considerano questo tipo di investimento un'opportunità per trattenere il valore aggiunto inerente la trasformazione, distribuzione e vendita diretta del formaggio. Si tratta di alimentare una nicchia significativa all'interno del mercato del Parmigiano-Reggiano, grazie anche alle ubicazioni più favorevoli di queste strutture alle vie di comunicazione e ai grandi centri di consumo.

Assistiamo alla diffusione delle vendite dirette (negli spacci aziendali, nei mercatini locali ecc.), a quelle per via telematica, nonché di altre forme di riduzione della catena distributiva.

Anche l'agriturismo rappresenta una quota importante di estensione dell'attività agricola, perché trascina con sé altre iniziative di lavoro (fattorie didattiche, turismo verde, ecc.).

In definitiva ci dobbiamo attendere nel prossimo futuro un profondo cambiamento dei ruoli dell'imprenditore agricolo, in funzione dell'assunzione delle nuove competenze e al venir meno del sostegno finanziario pubblico al settore.

5.3 Il nuovo imprenditore agricolo

Le nuove opportunità d'intrapresa offerte al settore primario coinvolgono in prima persona l'imprenditore agricolo che deve essere all'altezza dei nuovi ruoli che gli vengono assegnati, molto diversi da quelli del passato (1).

La qualifica di imprenditore agricolo viene riconosciuta dalla pubblica amministrazione a coloro che hanno tutti i requisiti previsti dalla legge. Solo con il possesso del titolo è possibile accedere a certe agevolazioni per il settore agricolo, secondo le normative vigenti di politica agricola.

La legge di orientamento volta all'ammodernamento dell'agricoltura italiana aveva in agenda diverse normative da elaborare tra le quali quella del titolo di imprenditore agricolo. Secondo la vecchia normativa, risalente al 1975, valeva il titolo di Imprenditore agricolo a titolo principale (Iatp) che la nuova normativa (Decreto legislativo n. 99/2004) ha modificato in Imprenditore agricolo professionale (Iap).

Le differenze sostanziali tra le due figure professionali tengono conto di tre parametri principali:

- il tempo dedicato all'attività agricola;
- il reddito conseguito dall'attività agricola;
- le capacità professionali.

Nella tabella seguente sono riportati i caratteri differenziali tra la vecchia e la nuova figura professionale dell'imprenditore agricolo.

Tabella 4: Caratteri differenziali della figura dell'imprenditore agricolo.

Ordine	Requisiti	VECCHIA (1975) Imprenditore agricolo a titolo principale (Iatp)	NUOVA (2004) Imprenditore agricolo professionale (Iap)
1	Quota minima di tempo di lavoro agricolo	2/3	1/2 (25% in zone svantaggiate)
2	Quota minima di reddito da lavoro agricolo	2/3	1/2 (25% in zone svantaggiate)
3	Capacità professionale	- Titolo di studio agrario - Tre anni di attività agricola - Corso con esame	Fissata dalle regioni

Il requisito del tempo minimo da dedicare all'attività agricola era dei 2/3 nella vecchia normativa e si riduce a 1/2 nella nuova, con la possibilità nelle zone svantaggiate di arrivare solamente al 25%.

Anche per il requisito del reddito minimo derivabile dal lavoro agricolo sono state introdotte le stesse modifiche previste per il requisito del tempo. In agricoltura la determinazione del reddito è legata alle valutazioni catastali, che sono standard, per cui è possibile prescindere in questi casi dal reddito agrario e fare riferimento per il riconoscimento della qualifica professionale alle effettive risultanze economiche dell'azienda sulla base delle risultanze di bilancio.

Le modifiche introdotte si prefiggono l'obiettivo di facilitare la permanenza nel settore agricolo degli addetti, in particolare nelle zone svantaggiate, nelle quali è più difficile assicurare un reddito familiare soddisfacente proveniente dalla sola attività agricola (4, 22). Ben vengano quindi anche le attività agricole part-time, senza le quali avremmo l'abbandono del territorio.

Per quanto riguarda il riconoscimento delle capacità professionali le competenze vengono trasferite dallo Stato alle regioni, che stanno legiferando in merito. In questo caso i requisiti di riferimento rimarranno sostanzialmente quelli legati a: possesso di un titolo di studio agrario, in subordine l'avere esercitato almeno per alcuni anni l'attività agricola. In mancanza di questi requisiti, che danno il via libera al riconoscimento delle capacità professionali, sarà necessario seguire un corso di preparazione specifica, con un esame finale, in analogia con quanto avviene per altre attività economiche, come nel settore del commercio.

Con la qualifica professionale è possibile accedere alle agevolazioni tributarie, a quelle previdenziali e creditizie, nonché ad altre facilitazioni per il settore agricolo, come per le norme urbanistiche. Con l'iscrizione dell'imprenditore agricolo alla previdenza INPS si acquisiscono i requisiti analoghi a quelli del coltivatore diretto, senza per altro che venga richiesta la presenza di attività manuale.

Con le nuove norme è possibile estendere la qualifica di Iap, con i relativi benefici, anche alle attività agricole condotte in forma societaria, purché sussistano alcune condizioni.

Tabella 5: Riconoscimento della qualifica di Iap alle società agricole.

Ordine	Requisiti	Tipo di società
1	Con almeno un socio Iap	Di persone
2	Con almeno un amministratore socio Iap	Cooperative
3	Con almeno un amministratore Iap	Di capitali

6. Alcune considerazioni conclusive

Il futuro della nostra agricoltura è legato in larga misura alle capacità degli imprenditori agricoli di adeguarsi alle nuove opportunità d'intrapresa che vengono offerte con le recenti riforme della politica agricola a livello di UE, nazionale e regionale.

Le nuove attività, che estendono le competenze del settore agricolo rispetto al passato verso gli altri settori produttivi, si differenziano da quelle tradizionali per tre condizioni molto importanti:

- sono ad elevato valore aggiunto;
- sfuggono alla condizione di *price-taker*;
- non sono vincolate alle dimensioni fisiche dell'azienda.

Ciò presuppone un ricambio generazionale, con imprenditori di nuova professionalità, con vasta cultura, preparazione tecnica, economica e mercantile e capaci di relazioni con gli altri e con la società civile.

I giovani agricoltori sono chiamati in prima linea ad assumere le nuove professionalità che possano agevolare lo sviluppo e l'innovazione di un'agricoltura competitiva (2), multifunzionale e sostenibile, in grado di offrire al territorio rurale beni e servizi in un'ottica di integrazione intersettoriale in termini di risposta alle esigenze della società che si svolga su un piano paritario, ma rispettoso delle funzioni proprie di ciascun settore produttivo.

Per raggiungere questi obiettivi è essenziale avere agricoltori con uno spirito giovanile in grado di innovare e investire in questa nuova realtà. Di qui la necessità di agevolare il ricambio generazionale in agricoltura con interventi di sostegno e di indirizzo per i giovani che si accingono ad affrontare le nuove sfide con impegno e idee innovative.

Il nuovo imprenditore agricolo è chiamato a spostare il suo interesse dalla funzione tradizionale di produzione di beni a quella moderna della prestazione di servizi:

- alle persone;
- alla collettività;
- al territorio.

L'obiettivo imprenditoriale è quello di raggiungere il massimo reddito, compatibilmente con le condizioni in cui opera. La strategia d'impresa è rivolta all'ampliamento del budget: con l'agricoltura tradizionale l'imprenditore aveva pochi spazi di manovra, per la ristrettezza della maglia aziendale, inadeguata al perseguimento delle economie di scala necessarie per la riduzione dei costi di produzione ed accre-

scere la forbice tra costi e prezzi a proprio favore; con le nuove opportunità d'impresa è possibile allargare il budget indipendentemente dalla maglia aziendale, consentendo la permanenza nel settore agricolo di addetti con benefici per l'azienda, per la società e per il territorio (5).

Il nuovo imprenditore agricolo è ancora tutto da riscoprire, vanno definiti i modelli, sperimentate le iniziative, adattate alle condizioni aziendali ed ambientali in cui si opera, stimolato lo spirito innovativo per rispondere alle esigenze dei consumatori singoli e collettivi secondo l'evoluzione della società. Ciò richiede uno spirito imprenditoriale dinamico e innovativo che presuppone nuove strategie d'impresa. Sono problemi attuali che sono stati discussi anche nel XLIII Convegno annuale di Studi della SIDEA che ha approfondito il tema "Agricoltura e mercati in transizione".

Bibliografia

1. AGNOLI M. (2001). Si estende la categoria degli imprenditori agricoli. In *Terra e Vita*, n. 45, 169-170.
2. BALLARI G. (2005). I giovani e l'agricoltura europea: nuove opportunità di sviluppo. In *Agriregionieuropa*, n. 2, 21-23.
3. COMMISSIONE EUROPEA (1959). Raccolta dei documenti della Conferenza agricola degli Stati Membri, Stresa, luglio 1958, Bruxelles.
4. FINCO A., DI PRONIO G., POLLONARA M. (2005). Multifunzionalità e sviluppo rurale delle zone montane. In *Rivista di Economia Agraria*, n. 2, 449-468.
5. FRANCO S., DE SANTIS V. (2005). Tipologie d'impresa, multifunzionalità e strumenti di contabilità aziendale. In *Rivista di Economia Agraria*, n. 2, 429-448.
6. FRASCARELLI A. (2005). Valutazione ed effetti delle scelte nazionali della riforma Fischler della PAC. Relazione presentata al XLII Convegno di Studi SIDEA su: "Biodiversità e tipicità: paradigmi e strategie competitive". Pisa, 22-24 settembre 2005.
7. FUSAI C. (2004). I prodotti inclusi nel reddito agrario. In *Terra e Vita*, n. 18, 12-14.
8. GARGANO N., SARDONE R. (2004). Multifunzionalità e ambiente. In Inea: Verso il riconoscimento di un'agricoltura multifunzionale. Edizioni Scientifiche Italiane, Napoli.
9. HENKE R. (a cura di), (2004). *Verso il riconoscimento di una agricoltura multifunzionale*. Teorie, politiche, strumenti. Edizioni Scientifiche Italiane, INEA, Roma.
10. HOFFMANN A. (2006). La nuova politica di sviluppo rurale. Franco Angeli, Milano.
11. IDDA L., FURESI R., PULINA P. (2005). Mid Term Review e multifunzionalità. In *Rivista di Economia Agraria*, n. 2, 195-222.
12. INEA (2005). Le politiche comunitarie per lo sviluppo rurale. Un bilancio di metà percorso. Rapporto 2003/2004. INEA, Roma.

13. INEA (2006). Politiche agricole dell'Unione Europea. Rapporto 2004-2005. INEA, Roma.
14. ISTAT (2004). V° Censimento Generale dell'Agricoltura, 2000, ISTAT, Roma.
15. MARTINO F. (2006). Sviluppo rurale in Italia nel periodo 2007-2013. In *Agriregionieuropa*, n. 4, 1-6.
16. OCSE (1998). Multifunctionality: A Framework for policy Analysis. Documento OCSE (OECD, AGR/CA 98 -9).
17. PAMPANINI R. (2006). Ruolo dell'agricoltura nelle economie mature. Relazione presentata al XLIII Convegno SIDEA su: *Agricoltura e mercati in transizione*. Assisi, 7-9 settembre 2006.
18. PECCI F. (2005). Le trasformazioni recenti dell'agricoltura italiana. *Agriregionieuropa*, n. 2, 28-30.
19. PLOEG J. D. Van Der (2005). Diversità delle forme di impresa e sviluppo rurale. Relazione presentata al XLII Convegno di Studi SIDEA su: *Biodiversità e tipicità: paradigmi e strategie competitive*. Pisa, 22-24 settembre 2005.
20. PLOEG J. D. Van Der (2003). The virtual farmer, Assen: Van Gorcum.
21. PRETOLANI R. (2004). Contenuti e problematiche della riforma. In IreR: *Riforma della PAC e impatto sul sistema agricolo lombardo*. Rapporto finale, Milano.
22. RAFFAELLI R., GIOS G., NOTARO S., MOLFETTA P. (2005). Riforma della PAC e multifunzionalità del sistema zootecnico alpino. In *Rivista di Economia Agraria*, n. 2, 311-362.
23. SABBATINI M. (2006). Competitività e strategie emergenti nelle imprese agricole. Relazione presentata al XLIII Convegno SIDEA su: *Agricoltura e mercati in transizione*. Assisi, 7-9 settembre 2006.
24. SALGHETTI A. (2000). Evoluzione e prospettive delle aziende agricole parmensi tra secondo e terzo millennio. Istituto di Economia Rurale e Zooeconomia, Università degli Studi di Parma.
25. SOTTE F. (2005). Quante sono le imprese agricole in Italia? In *Agriregionieuropa*, n. 2, <http://www.agreregionieuropa.it/>.
26. VELASQUEZ B. E. (2004). Multifunzionalità: definizione, aspetti tecnico-economici e strumenti. In Inea: *Verso il riconoscimento di un'agricoltura multifunzionale*. Edizioni Scientifiche Italiane, Napoli.
27. VIAGGI D. (2003). Economia dei contratti e nuove tipologie di impresa in un'agricoltura multifunzionale. In "Atti del XXXIX Convegno di Studi SIDEA su: *Nuove tipologie di impresa nell'agricoltura italiana*. Firenze, 12-14 settembre 2002, 83-120.

LA RIFORMA DI MEDIO TERMINE DELLA POLITICA AGRICOLA COMUNITARIA CON PARTICOLARE RIFERIMENTO AL SETTORE ZOOTECNICO*

G. Ferri**

PAROLE CHIAVE: Politica agricola comunitaria, disaccoppiamento, sviluppo rurale, competitività, zootecnia.

KEY WORDS: Community agricultural policy, decoupling, rural development, competitiveness, zootechnics.

Riassunto

La riforma di medio termine della Politica Agricola Comunitaria con particolare riferimento al settore zootecnico.

La riforma di medio termine della politica agricola comunitaria (PAC) è una tappa fondamentale che inciderà notevolmente sull'evoluzione e sulla consistenza delle imprese agricole zootecniche. La riforma introdotta nel 2003 dall'Unione Europea doveva essere una semplice correzione di Agenda 2000, è stata invece tra le più significative tra quelle attuate dalla nascita della comunità ad oggi. L'analisi percorre un breve excursus storico della PAC che meglio aiuta a comprendere le ragioni di un cambiamento di rotta così radicale. Successivamente vengono analizzati i tempi e i modi di applicazione del Regolamento (CE) 1782/03 a livello nazionale per i vari settori produttivi con particolare attenzione a quelli del latte e della carne bovina. Il disaccoppiamento dei contributi comunitari rispetto alla produzione, se da una parte potrebbe orientare i produttori verso scelte mercantili, dall'altra potrebbe innescare un processo di abbandono delle produzioni, a fronte della riscossione di aiuti come rendita dei diritti acquisiti. Il lavoro si conclude con l'analisi del Regolamento (CE) 1698/05 riguardante lo sviluppo rurale, tema che riveste un ruolo sempre più centrale e fondante dell'intervento comunitario sul settore agricolo.

Summary

The medium-term reform of the Community Agricultural Policy with particular reference to the zootechnical sector.

The medium-term reform of the Community Agricultural Policy (CAP) is a fundamental milestone which will have considerable effect on the evolution and dimensions of zootechnical agricultural businesses. The reform, which was introduced

* Lavoro eseguito con finanziamento FIL (ex quota 60%).

** Sezione di Risorse del Territorio, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma

in 2003 by the European Union, was intended initially merely as a correction of the Agenda 2000, but proved to be one of the most significant reforms ever implemented since the Community was formed till the present day. The analysis provides a brief historical excursus of the CAP for the purpose of better understanding the reasons for such a radical change of route. Subsequently, the timescale and modes of application of EC Regulation 1782/03 at a national level are analysed for the various production sectors, with special emphasis of the milk and beef sectors. Although the decoupling of community contributions from production could orientate producers towards commercial choices, it could also lead to an abandonment of production, in the light of the subsidies being considered an income to which producers are entitled as an acquired right. The paper concludes with an analysis of EC Regulation 1698/05 regarding rural development, a theme that is assuming a fundamental role of increasingly central importance in community intervention in the agricultural sector.

1. Premessa

La politica agricola comunitaria (PAC) è andata evolvendosi in funzione del mutare del settore agricolo, delle condizioni economiche dei paesi aderenti e della globalizzazione dei mercati. Il settore agricolo è stato protagonista in Europa di una notevole evoluzione, soprattutto dal dopoguerra in avanti. La tranquillità bellica ha consentito la diffusione e l'applicazione di importanti innovazioni nel modo di coltivare i campi ed allevare gli animali. Non dimentichiamo che queste tecniche erano già note a partire dalla fine del secolo XIX e venivano diffuse tramite le cosiddette "Cattedre ambulanti". Seguirà la prima guerra mondiale, il ventennio fascista, in cui la coltivazione dei campi e la bonifica dei terreni ancora incolti saranno uno dei punti di forza dello sviluppo del regime, quindi la seconda guerra mondiale, la pace, e la necessità di dover ricostituire le scorte alimentari esauritesi durante gli anni del conflitto.

Contemporaneamente lo sviluppo industriale del paese richiede sempre maggiore forza lavoro anche nel settore secondario, quindi si assiste allo spopolamento delle campagne e alla migrazione dei lavoratori verso le città. A questo fenomeno non si accompagna comunque una diminuzione nella capacità produttiva del settore primario, perché grazie al processo di modernizzazione dell'agricoltura (l'avvento della meccanizzazione, la diffusione della chimica, la specializzazione produttiva) si determina un forte aumento delle rese produttive. Tra il 1950 ed il 1970 si registrano incrementi annui di produttività della terra mai visti prima (oltre il 5%), incrementi nella capacità di produrre alimenti che danno forza alla crescita demografica e allo sviluppo industriale (4).

Questa crescita economica viene agevolata dalla politica agricola comunitaria basata sul sostegno dei prezzi e sulla protezione delle produzioni agricole dalla concorrenza dei prodotti esteri. A partire dalla fine degli anni '70 questo modello di sviluppo comincia ad incrinarsi. Infatti le quantità di beni alimentari prodotti sono superiori alle richieste del consumo; conseguenza sono l'accumularsi di scorte a livello comunitario e le difficoltà finanziarie collegate al mantenimento di un sistema agricolo protetto dal confronto con i mercati internazionali. Il consumatore stesso è cambiato, ha raggiunto la soddisfazione dei fabbisogni alimentari, il suo reddito è

aumentato e comincia a chiedere beni di qualità e sicuri dal punto di vista alimentare. Dall'altra parte il sistema produttivo agricolo ancora non si è adeguato, si confronta poco col mercato e con le sue nuove esigenze. In compenso però continua a spingere il piede sull'acceleratore e sull'utilizzo di sempre maggiori mezzi tecnici, come se l'incremento delle rese produttive fosse l'unico obiettivo da perseguire. Questo comportamento porta con sé altri problemi legati alla funzione dell'agricoltura, allo sfruttamento delle risorse naturali e dell'ambiente (che per la prima volta paiono non essere inesauribili).

Nel frattempo l'accresciuta attenzione della collettività ai problemi dell'ambiente nel quale viviamo porteranno, a partire dagli anni '80, a una inversione di rotta nella politica agricola della Comunità Europea. Questa infatti si rende conto di non poter più sostenere né da un punto di vista economico, né tantomeno giustificare un settore agricolo che utilizzi tecniche così intensive. Si assiste dunque alla promulgazione di direttive e regolamenti che contengono misure nuove, quali l'istituzione di quote di produzione, la dismissione della coltivazione di superfici, tasse di corresponsabilità, ecc.

La linea d'azione intrapresa viene percorsa con maggior vigore con la riforma del 1992 attuata da Mac Sharry, che cambia il meccanismo di attribuzione degli aiuti eliminando il sostegno ai prezzi ed instaurando il pagamento diretto sulla base della superficie coltivata a seminativi (grano, mais, soia, ecc.) o non coltivata (set aside), spostando così l'attenzione dell'imprenditore agricolo che ha percepito lo stesso aiuto indipendentemente dalla quantità di produzione ottenuta. Questo per determinare la diminuzione delle rese produttive e quindi delle eccedenze comunitarie di derrate alimentari. Il minor utilizzo di mezzi di produzione (concimi chimici e antiparassitari) contribuisce anche ad una maggior tutela ambientale. Dunque un'agricoltura meno intensiva e più sostenibile. Al tempo stesso gli imprenditori sono stati stimolati a continuare a coltivare anche le aree più marginali, meno produttive, che senza l'incentivo per ettaro sarebbero state abbandonate anzitempo, apportando così ulteriori benefici per la collettività.

Agenda 2000 continua nella stessa direzione iniziata negli anni '80 introducendo, a fianco dei pagamenti diretti, il cosiddetto secondo pilastro della PAC, basato sul sostegno allo sviluppo rurale. Inoltre si comincia a parlare di ecocondizionalità, e della facoltà per i paesi membri di subordinare i pagamenti diretti al rispetto e alla salvaguardia dell'ambiente da parte dell'agricoltore. La funzione sociale dell'agricoltura non è più solo quella di produrre alimenti, ma anche quella di produrre servizi per l'ambiente ed il territorio (2, 6).

2. L'applicazione del Regolamento (CE) 1782/03

Il Regolamento (CE) 1782/03 stabilisce un nuovo regime di sostegno diretto a favore degli agricoltori modificando numerosi regolamenti precedenti.

La principale novità introdotta è quella riguardante il regime unico di pagamento. Il sistema prevede i pagamenti diretti all'agricoltore in virtù dei diversi regimi preesistenti unificandoli in un unico pagamento determinato sulla base dei diritti maturati in precedenza nell'arco di un periodo di riferimento.

L'obiettivo di tale regime di sostegno, stabilito dallo stesso regolamento, è quello di assicurare un equo tenore di vita alla popolazione agricola che ha il compito del mantenimento delle zone rurali.

Altra importante finalità che dovrebbe conseguirsi è il potenziamento della competitività dell'agricoltura attraverso lo spostamento del sostegno dal prodotto al produttore, attraverso l'introduzione del cosiddetto *disaccoppiamento*; ogni azienda sarà libera di orientarsi alla produzione dei beni maggiormente richiesti dal mercato, continuando a percepire ugualmente i contributi legati in passato alle misure di mercato.

Il regolamento introduce la cosiddetta *condizionalità* che riguarda la subordinazione del pagamento integrale degli aiuti al rispetto di norme riguardanti la produzione e l'attività agricola. In particolare queste regole riguardano una serie di requisiti fondamentali in materia di sicurezza alimentare, di benessere e salute degli animali, e di buone condizioni agronomiche e ambientali (5). Se tali requisiti prioritari non sono rispettati, gli Stati membri dovrebbero revocare, interamente o parzialmente, gli aiuti diretti, sulla base di criteri proporzionati che tengano conto della gravità, della durata e della frequenza dell'infrazione commessa. Nel nostro Paese il MiPAF ha pubblicato un manuale operativo che illustra i diversi aspetti relativi alla condizionalità, specificando, tra le altre cose, i criteri di riduzione del sostegno agli agricoltori in caso di inosservanza dei requisiti.

Il Regolamento (CE) 796/04 prevede che il controllo per accertare il rispetto dei requisiti e delle norme sia affidato ad enti di controllo specializzati. Gli Organismi pagatori, invece, sono responsabili della determinazione delle riduzioni ed esclusioni da applicare nel caso di mancato rispetto della condizionalità. È prevista però una deroga e lo Stato membro può decidere di affidare al medesimo Organismo pagatore anche i controlli relativi al rispetto della condizionalità. In questo senso si è mossa l'Italia che col Decreto n. 5406 del 2004 del MiPAF ha delegato gli Organismi pagatori anche al controllo. In Italia il controllo è affidato ad Agea e agli organismi pagatori regionali.

Per ottenere un migliore equilibrio tra gli strumenti politici diretti a promuovere l'agricoltura sostenibile e quelli intesi ad incentivare lo sviluppo rurale, viene introdotto un sistema di riduzione progressiva dei pagamenti diretti, per il periodo 2005-2012. Tutti i pagamenti diretti che superano un determinato importo dovranno essere ridotti in ragione di una certa percentuale annua. Il risparmio così realizzato dovrebbe essere utilizzato per finanziare misure di sviluppo rurale. Questa misura, che prende il nome di *modulazione*, va nella direzione di riequilibrare il sostegno agricolo tra misure di mercato ("primo pilastro") e misure di sviluppo rurale ("secondo pilastro"). Infatti fino all'applicazione della riforma tale rapporto risultava essere sbilanciato a favore del primo pilastro con circa 40 miliardi di euro, a fronte dei circa 4 miliardi di euro utilizzati per il finanziamento dello sviluppo rurale.

Per aiutare gli agricoltori a conformarsi ai requisiti di un'agricoltura moderna e di alto livello qualitativo, viene richiesta dal regolamento in oggetto anche l'introduzione di un *sistema di consulenza* aziendale. Tale sistema di consulenza dovrebbe essere inteso a sensibilizzare e informare gli agricoltori sui flussi materiali e sui processi aziendali che hanno attinenza con l'ambiente, la sicurezza alimentare,

la salute e il benessere degli animali, fermo restando l'obbligo degli agricoltori di rispettare le norme in materia.

Come si accennava, l'importo cui l'agricoltore ha diritto in forza del nuovo regime è calcolato riferendosi agli importi corrispostigli durante un periodo di riferimento (triennio 2000-2002). Viene comunque costituita una riserva nazionale destinata ad affrontare situazioni specifiche e ad agevolare la partecipazione di nuovi agricoltori al regime.

L'importo complessivo a cui un'azienda ha diritto è suddiviso in quote (diritti all'aiuto) e rapportato ad un determinato numero di ettari. Per evitare trasferimenti speculativi che darebbero luogo all'accumulo di diritti senza una corrispondente base agricola, all'atto di concedere l'aiuto occorre vi sia un legame tra i diritti ed un certo numero di ettari corrispondenti. I titoli così definiti sono registrati all'interno del SIAN (Sistema informativo agricolo nazionale) e quindi a disposizione di ciascuna azienda che può consultare i propri dati rivolgendosi ai CAA (Centri di assistenza agricola) (3).

Tali diritti saranno poi ridotti negli anni per effetto della modulazione di cui abbiamo parlato; la riduzione è stata del 3% nel 2005, sarà del 4 % nel 2006 e del 5% negli anni dal 2007 al 2012, così come specificato dall'articolo 10 del Regolamento (CE) 1782/03. Gli importi risultanti dall'applicazione delle riduzioni sono messi a disposizione come sostegno supplementare comunitario alle misure dei programmi di sviluppo rurale finanziati dalla sezione Garanzia del FEAOG. L'importo corrispondente ad un punto percentuale è assegnato allo Stato membro in cui gli importi corrispondenti si sono resi disponibili.

A tutti i produttori spetta poi un aiuto aggiuntivo chiamato *aiuto supplementare* pari al prelievo effettuato sui primi 5 mila euro di pagamenti. L'ammontare complessivo dei pagamenti supplementari dei produttori di uno stato membro non può superare il massimale assegnato ad ogni Paese per questo tipo di contributi. L'allegato II del regolamento definisce per i singoli Paesi i relativi massimali. Per l'Italia la somma massima erogabile per questi aiuti supplementari è stata di 62 milioni di euro nel 2005, sono 84 milioni di euro per il 2006 e saranno 106 milioni di euro per il 2007 e gli anni successivi. Se viene raggiunta la somma massima gli Stati membri procedono ad un adeguamento percentuale lineare degli aiuti supplementari in modo da rispettare i limiti imposti dall'allegato II.

2.1 I criteri di gestione obbligatori

Il principio di rispetto dell'ambiente introdotto a partire dai primi anni '80 trova la sua massima espressione nella ecocondizionalità che vincola il pagamento dei premi comunitari all'osservanza e al rispetto di precise norme di gestione della propria azienda, meglio definite come criteri di gestione obbligatori enunciati agli articoli 3 e 4 del Regolamento. I criteri di gestione obbligatori riguardano in particolare tre aspetti:

- la sanità pubblica e la salute delle piante e degli animali;
- l'ambiente;
- il benessere degli animali.

Al comma 2 dell'articolo 3 si specifica che sono i singoli stati membri che devono fissare l'elenco dei criteri di gestione e le buone condizioni agronomiche e ambientali da rispettare.

L'allegato III specifica in maniera dettagliata i riferimenti normativi cui fare riferimento e i tempi di applicazione dei singoli criteri. A livello nazionale tale allegato è stato recepito dal Decreto del Ministro delle Politiche Agricole e Forestali del 13 dicembre 2004 che all'allegato I trasforma queste normative comunitarie nei cosiddetti Atti. Si riportano di seguito le norme che sono state introdotte o che lo saranno in futuro, che rendono ragione dei numerosi e diversi campi trattati.

Hanno già trovato applicazione dal 1 gennaio 2005 una serie di normative che si riportano di seguito per tipo di intervento.

Relativamente all'ambiente

- Atto 1 - Direttiva 79/409/CEE del Consiglio, del 2 aprile 1979, concernente la conservazione degli uccelli selvatici.

- Atto 2 - Direttiva 80/68/CEE del Consiglio, del 17 dicembre 1979, concernente la protezione delle acque sotterranee dall'inquinamento provocato da certe sostanze pericolose.

- Atto 3 - Direttiva 86/278/CEE del Consiglio, del 12 giugno 1986, concernente la protezione dell'ambiente, in particolare del suolo, nell'utilizzazione dei fanghi di depurazione in agricoltura.

- Atto 4 - Direttiva 91/676/CEE del Consiglio, del 12 dicembre 1991, relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole.

- Atto 5 - Direttiva 92/43/CEE del Consiglio, del 21 maggio 1992, relativa alla conservazione degli habitat naturali e seminaturali e della flora e della fauna selvatiche.

Relativamente alla sanità pubblica e alla salute degli animali

- Atto 6 - Direttiva 92/102/CEE del Consiglio, del 27 novembre 1992, relativa all'identificazione e alla registrazione degli animali.

- Atto 7 - Regolamento (CE) 2629/97 della Commissione, del 29 dicembre 1997, che stabilisce modalità di applicazione del Regolamento (CE) 820/97 del Consiglio per quanto riguarda i marchi auricolari, il registro delle aziende e i passaporti previsti dal sistema di identificazione e di registrazione dei bovini.

- Atto 8 - Regolamento (CE) 1760/00 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 17 luglio 2000, che istituisce un sistema di identificazione e di registrazione dei bovini e relativo all'etichettatura delle carni bovine e dei prodotti a base di carni bovine, e che abroga il Regolamento (CE) 820/97 del Consiglio.

- Atto 8 bis - Regolamento (CE) 21/04 del Consiglio, del 17 dicembre 2003, che istituisce un sistema di identificazione e di registrazione degli ovini e dei caprini e che modifica il Regolamento (CE) 1782/03 e le Direttive 92/102/CEE e

64/432/CEE (G.U.C.E. L 5 del 9.1.2001).

Hanno trovato applicazione invece da gennaio 2006 un'altra serie di normative.

Sanità pubblica, salute degli animali e delle piante

- Direttiva 91/414/CEE del Consiglio, del 15 luglio 1991, relativa all'immissione in commercio dei prodotti fitosanitari.

- Direttiva 96/22/CE del Consiglio, del 29 aprile 1996, concernente il divieto d'utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze agoniste nelle produzioni animali e che abroga le Direttive 81/602/CEE, 88/146/CEE e 88/299/CEE.

- Regolamento (CE) 178/02 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.

- Regolamento (CE) 999/01 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 maggio 2001, recante disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicazione di alcune encefalopatie spongiformi trasmissibili.

Notifica delle malattie

- Direttiva 85/511/CEE del Consiglio, del 18 novembre 1985, che stabilisce misure comunitarie di lotta contro l'afta epizootica.

- Direttiva 92/119/CEE del Consiglio, del 17 dicembre 1992, che introduce misure generali di lotta contro alcune malattie degli animali nonché misure specifiche per la malattia vescicolare dei suini.

- Direttiva 2000/75/CE del Consiglio, del 20 novembre 2000, che stabilisce disposizioni specifiche relative alle misure di lotta e di eradicazione della febbre catarrale degli ovini.

Applicabili a decorrere dal 1° gennaio 2007

Benessere degli animali

- Direttiva 91/629/CEE del Consiglio, del 19 novembre 1991, che stabilisce le norme minime per la protezione dei vitelli.

- Direttiva 91/630/CEE del Consiglio, del 19 novembre 1991, che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini.

- Direttiva 98/58/CE del Consiglio, del 20 luglio 1998, riguardante la protezione degli animali negli allevamenti.

Il Regolamento (CE) 796/04 riporta le modalità applicative della condizionalità e il relativo sistema di controllo, mentre il Decreto del Ministro delle Politiche Agricole

e Forestali del 13 dicembre 2004 ha emanato le disposizioni specifiche per l'applicazione della condizionalità in Italia a partire dal 2005. Il decreto ministeriale del 15 dicembre 2005 definisce l'entrata in vigore dei nuovi CGO a partire dal 2006 e dal 2007.

La lettura delle numerose norme introdotte o in fase d'introduzione fornisce la misura dei numerosi adempimenti da svolgere relativamente alla coltivazione dei campi e all'allevamento degli animali. Si tratta oltre che di rispettare delle regole di comportamento ambientale, anche di compiere atti amministrativi, che rendono sempre più onerosa in termini di tempo la conduzione dell'azienda per l'imprenditore agricolo, figura spesso sola a svolgere tutte le mansioni aziendali, che non dispone di altre persone cui delegare questi nuovi compiti. Ecco che allora se l'azienda non è strutturata diversamente, queste mansioni sono svolte anche da familiari del titolare che pur avendo anche altre attività sono chiamati ad aiutare in azienda. È un chiaro esempio di pluriattività (4).

2.2 Buone Condizioni Agronomiche e Ambientali (BCAA)

All'articolo 5 del regolamento vengono definite le buone condizioni agronomiche e ambientali. Gli Stati membri definiscono a livello nazionale o regionale i requisiti minimi per le buone condizioni agronomiche e ambientali sulla base dello schema riportato nell'allegato IV del regolamento, tenendo conto delle caratteristiche peculiari delle superfici interessate, comprese le condizioni del suolo e del clima, i sistemi aziendali esistenti, l'utilizzazione della terra, la rotazione delle colture, le pratiche aziendali e le strutture aziendali, tenendo conto anche delle norme che disciplinano le buone pratiche agronomiche definite dal Regolamento (CE) 1257/99.

Si riportano qui sotto gli obiettivi e le norme specificati nell'allegato:

Obiettivo	Norme
Erosione del suolo: proteggere il suolo mediante misure idonee	- Copertura minima del suolo - Minima gestione delle terre che rispetti le condizioni locali specifiche - Mantenimento delle terrazze
Sostanza organica del suolo: mantenere i livelli di sostanza organica del suolo mediante opportune pratiche	- Norme inerenti alla rotazione delle colture ove necessario - Gestione delle stoppie
Struttura del suolo: mantenere la struttura del suolo mediante misure adeguate	- Uso adeguato delle macchine
Livello minimo di mantenimento: assicurare un livello minimo di mantenimento ed evitare il deterioramento degli habitat	- Densità di bestiame minime e regimi adeguati - Protezione del pascolo permanente - Mantenimento degli elementi caratteristici del paesaggio - Evitare la propagazione di vegetazione indesiderata sui terreni agricoli

A livello nazionale l'Allegato 2 del già citato Decreto Ministeriale 13 dicembre 2004, che recepisce l'articolo 5 del Regolamento (CE) n. 1782/03, stabilisce le **Buone Condizioni Agronomiche e Ambientali (BCAA)** fissando le "Norme" per garantire il raggiungimento degli obiettivi prioritari fissati dall'Unione Europea:

Norma 1.1: regimazione delle acque superficiali nei terreni in pendio;

Norma 2.1: gestione delle stoppie e dei residui colturali;

Norma 3.1: mantenimento in efficienza della rete di sgrondo per il deflusso delle acque superficiali;

Norma 4.1: protezione del pascolo permanente;

Norma 4.2: gestione delle superfici ritirate dalla produzione;

Norma 4.3: manutenzione degli oliveti;

Norma 4.4: mantenimento degli elementi caratteristici del paesaggio.

Il già citato Decreto Ministeriale del 15 dicembre 2005 relativamente alle BCAA lascia inalterato per il 2006 l'insieme delle norme, mentre i contenuti di alcune di esse vengono modificati a seguito dell'esperienza acquisita nel corso del 2005, primo anno di applicazione.

Dunque da quanto si evince è evidente che l'introduzione del regime integrato di pagamento unico presuppone il rispetto di numerose condizioni che vengono progressivamente richieste alle imprese agricole che fanno domanda di accesso a tale regime di contribuzione.

A tal fine viene introdotto un sistema di consulenza aziendale per gli agricoltori in materia di conduzione della terra e dell'azienda che tenga conto dei criteri di gestione obbligatori e delle buone condizioni agronomiche e ambientali.

Oltre ai Regolamenti (CE) 1782/03 e 1783/03, che hanno previsto l'istituzione in ogni paese membro di un sistema di consulenza entro il 2007 per sostenere gli agricoltori nell'applicazione della condizionalità, anche il Regolamento (CE) 1698/05 ripropone questo aspetto ampliando il campo di azione dei servizi al miglioramento della competitività aziendale e allo sviluppo del potenziale umano (3). In particolare i temi previsti sono quelli della qualità dei prodotti, delle nuove tecnologie, della gestione sostenibile delle risorse naturali (compresi evidentemente i requisiti di condizionalità e le pratiche produttive compatibili con l'ambiente). L'altro obiettivo, la «competitività del settore agricolo e forestale», dovrebbe raggiungersi con il sostegno nella valutazione del rendimento aziendale e nelle scelte di cambiamento da apportare (sempre compatibilmente con i criteri di gestione obbligatori e la normativa in materia di sicurezza sul lavoro).

Specifico riferimento a questo obiettivo è fatto nell'Asse I del Regolamento (CE) 1698/05 sullo sviluppo rurale, con le misure relative ai servizi. In particolare si tratta di un sostegno all'imprenditore agricolo (pari all'80% della spesa per un massimo di 1.500 euro) che usufruisca di una consulenza tesa a migliorare il rendimento globale dell'azienda non dimenticando i criteri di gestione obbligatoria e le buone condizioni agronomiche e ambientali di cui al Regolamento (CE) 1782/03 e i requisiti di sicurezza del lavoro.

Per il controllo della cosiddetta condizionalità ogni stato membro deve poi

istituire un sistema integrato di gestione e di controllo (SIGC) che comprenda come specifica l'articolo 18:

- a) una banca dati informatizzata, dove sono registrati per ciascuna azienda i dati ricavati dalle domande di aiuto;
- b) un sistema di identificazione delle parcelle agricole;
- c) un sistema di identificazione e di registrazione dei diritti all'aiuto ai sensi dell'articolo 21;
- d) le domande di aiuto;
- e) un sistema integrato di controllo, per la verifica delle condizioni di ammissibilità, con controlli amministrativi delle superfici e dei corrispondenti diritti e controlli in azienda a campione. La verifica riguarderà il rispetto dei criteri di gestione obbligatori e delle buone condizioni agronomiche ed ambientali.

A livello nazionale l'Agenzia per le erogazioni in agricoltura (AGEA) si occupa sia della verifica del regime di pagamento unico istituito dal Regolamento (CE) 1782/03 e del controllo della condizionalità.

Il SIGC prevede anche un sistema di identificazione e registrazione degli animali così come previsto dai già citati Direttiva 92/102/CEE e Regolamento (CE) 1760/00

2.3 Il settore lattiero caseario

Il settore lattiero caseario entra a far parte del sistema del disaccoppiamento a partire dal 2006, dopo il settore dei seminativi e della carne bovina che sono entrati nel regime di pagamento unico già dal 2005.

Il comparto è regolato da una OCM specifica che si è proposta negli anni di controllare i prezzi di mercato attraverso un complesso sistema di intervento fatto di prezzi indicativi e prezzi di intervento (per il burro e il latte in polvere), di aiuti all'ammasso (per i formaggi), di controllo degli scambi con i paesi terzi (basato su tariffe all'importazione e restituzioni sulle esportazioni).

Dal 1984 è stato introdotto anche un sistema di quote, per il controllo della produzione di latte con l'obiettivo di ridurre le eccedenze e contenere le spese comunitarie su questo settore, che dovrebbe rimanere in vigore almeno fino al 2015.

Agenda 2000 ha introdotto dei contributi per la macellazione degli animali adulti, al fine di sorreggere la filiera produttiva della carne bovina in evidente crisi di mercato. Anche il settore della zootecnia da latte ha beneficiato di questo premio che ha compensato la forte diminuzione di valore delle vacche di scarto (registrata dopo la diffusione del morbo della Bse) che rappresentano un ricavo complementare significativo per la Produzione Lorda Vendibile aziendale di un'impresa zootecnica bovina da latte.

La riforma di medio termine della PAC introduce importanti novità per il settore lattiero-caseario che vengono specificate nel Capitolo 7 del Titolo IV del Regolamento (CE) 1782/03. A partire dal 2004 i produttori del settore lattiero-caseario hanno potuto beneficiare di un premio calcolato sulla base della quantità di latte prodotta in azienda nel corso dell'annata. Il quantitativo di riferimento individuale (ossia il latte prodotto nell'annata a partire dal 1 aprile fino al 31 marzo dell'anno suc-

cessivo espresso in tonnellate), viene moltiplicato per un importo fisso ma diverso a seconda dell'annata. Si è trattato di 8,15 euro per l'anno 2004, 16,31 euro per il 2005 e saranno 24,49 euro per il 2006. A questi vanno poi sommati i pagamenti supplementari erogati dagli Stati membri a favore dei produttori operanti sul loro territorio pari agli importi globali annui indicati nel paragrafo 2 dell'articolo 95.

In deroga all'articolo 47, paragrafo 2, lo Stato membro può decidere che gli importi risultanti dai premi per i prodotti lattiero-caseari e dai pagamenti supplementari, previsti agli articoli 95 e 96, siano inclusi a livello nazionale o regionale, parzialmente o totalmente, nel regime di pagamento unico a decorrere dal 2005. L'Italia ha scelto di far entrare nel regime unico l'aiuto per il latte a partire dal 2006.

Dunque l'ingresso delle contribuzioni relative alla produzione di latte nel Pagamento Unico Aziendale (PUA) per l'Italia è a partire dall'annata in corso. È questo l'ultimo tassello della riforma approvata nel 2003, che ha previsto già dal 2004 la riduzione dei prezzi istituzionali del latte scremato in polvere e del burro e che ora prevede l'introduzione di pagamenti diretti, a compensazione di tale riduzione. È comunque un premio importante, che inizialmente rimase accoppiato alla produzione (annate 2004 e 2005 in Italia), ma poi venne disaccoppiato, andando ad incrementare il valore dei titoli di riferimento degli imprenditori agricoli zootecnici; 8 stati membri hanno deciso di introdurre il disaccoppiamento del latte già dal 2005 (tra cui Regno Unito e Germania), 5 lo introdurranno nel corso del 2006 (tra cui Italia, Francia e Spagna) e 2 lo inizieranno nel 2007 (Grecia e Olanda).

I pagamenti diretti accoppiati, come si accennava sopra, sono stati erogati a partire dal 2004 e comprendono un premio base ed un pagamento supplementare:

- il premio base viene moltiplicato per il quantitativo di riferimento individuale (QRI), che corrisponde alla quota latte disponibile al 31 marzo di ogni anno. La somma di tutti i QRI non dovrà comunque superare a livello nazionale la quota assegnata all'Italia nell'annata 1999/2000 che era di 9.960.060 tonnellate, anche se attualmente il quantitativo a disposizione a livello nazionale ammonta a 10.530.060 tonnellate per effetto dell'aumento di 600.000 tonnellate concesso all'Italia nel 2001/2002. Dunque i premi base fissati dal Regolamento (CE) 1782/03, dovranno ridursi di circa il 6%;

- il pagamento supplementare invece viene erogato al produttore secondo criteri decisi dai singoli Stati membri. Ad ogni Stato membro viene assegnato un plafond massimo che dovrà essere successivamente ripartito tra i produttori. Per l'Italia è stato 36,34 milioni di euro nel 2004, 72,89 milioni di euro nel 2005 e 109,33 milioni per il 2006 e anni successivi. Lo Stato italiano ha adottato con Decreto Ministeriale 23 aprile 2004 come criterio di suddivisione di queste somme tra i produttori la quantità di latte (in quota) effettivamente prodotta dai singoli.

Successivamente però un Decreto ministeriale del Ministro delle Politiche Agricole Forestali ha provveduto a unificare i criteri di ripartizione ed anche il pagamento supplementare verrà erogato sulla base della quota disponibile (ma non necessariamente prodotta) al 31 marzo 2006. Questo per evitare fenomeni di super-produzione legati al raggiungimento del massimo contributo possibile da parte dei produttori, che potevano generare ulteriori splafonamenti della produzione di latte oltre la quota nazionale disponibile.

Entrambi i pagamenti per l'Italia sono disaccoppiati a partire dal 2006. Gli agricoltori hanno comunque ricevuto già nel 2005 l'assegnazione dei titoli e delle superfici di riferimento relativi agli altri settori per cui il disaccoppiamento è già avvenuto (seminativi, riso, foraggi essiccati). I pagamenti relativi al settore lattiero-caseario vanno a sommarsi al pagamento unico aziendale, senza generare nuovi titoli, ma semplicemente incrementando il valore di quelli preesistenti. I nuovi valori dei titoli saranno poi decurtati degli importi relativi al mancato rispetto del massimale nazionale e per la riserva nazionale (che è stato nel 2005 del 7,5%), e della quota relativa alla modulazione.

Per quanto riguarda il trasferimento delle quote latte compravendute nel corso del 2005 sono efficaci a partire dal 1° aprile 2006 e quindi sono utili al compratore per la possibilità di produrre, ma non ai fini dell'acquisizione del diritto disaccoppiato (il diritto rimane perciò al cedente). Il trasferimento dei diritti è avvenuto invece nel caso dell'affitto delle quote per l'annata 2005/2006. Dunque chi ha affittato ha acquisito oltre alla possibilità di produrre anche i diritti legati alla quota che verranno fissati nel PUA dell'affittuario. Tale fatto avrebbe generato una perdita di valore notevole da parte del proprietario della quota (poteva essere successo che a causa di eventi eccezionali non fosse riuscito a produrre tutta la sua quota). Ancora una volta è intervenuto il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali che con il già citato Decreto Ministeriale all'articolo 2, facendo riferimento al Regolamento (CE) 795/04, ha disposto che in caso di *circostanze eccezionali o cause di forza maggiore* (meglio specificate dal Decreto Ministeriale 1628 del 20 luglio 2004), chi fosse stato costretto a cedere in affitto in tutto o in parte la propria quota latte nell'annata 2005/2006, avrebbe comunque potuto mantenere i diritti ad essa associati (2). Dunque nel caso di affitto temporaneo di quota per l'annata 2005/2006 e dove sia possibile provare la eccezionalità o le cause di forza maggiore accade che la quota dia diritto a titoli sia per il cedente che per l'affittuario, generando in questo modo una situazione se non altro anomala. Ciò però ha consentito, ed era questo l'obiettivo del Ministero, di non bloccare i trasferimenti temporanei di quota per l'annata presa in considerazione.

2.4 Le carni bovine

Il settore delle carni bovine è regolamentato a livello comunitario da una OCM specifica. Questo settore in passato ha goduto dell'intervento pubblico attraverso premi accoppiati che miravano a sostenere un settore particolarmente sensibile a crisi di mercato e scosso nell'ultimo decennio dal diffondersi in Europa del morbo della Bse con conseguente diminuzione dei consumi di carne bovina.

La normativa di riferimento è contenuta nel Regolamento (CE) 1254/99 che stabilisce le misure di intervento legate all'andamento dei prezzi, nonché una serie di aiuti diretti. Il meccanismo di acquisto pubblico scatta quando si raggiunge per due settimane di seguito un prezzo di mercato inferiore a 1.560 euro a tonnellata. Accanto a questa forma di intervento sono stati introdotti anche degli aiuti diretti per le vacche nutrici dal 1980 (pari a 200 euro a capo nel 2004), e per i capi maschi dal 1987 (per i manzi 150 euro a capo all'età di 9 e 21 mesi, per i vitelloni 210 euro a capo all'età di 9 mesi). Entrambi questi premi sono condizionati ad un vincolo di densità che non

può superare 1,8 UBA/ha. In questo senso viene previsto anche un premio di estensivazione per le aziende che abbiano densità di allevamento inferiore a 1,4 UBA/ha.

Il premio alla macellazione, di cui si accennava già precedentemente, viene riconosciuto agli allevatori per manzi, vacche e giovenche che abbiano più di 8 mesi di vita (80 euro per capo macellato), e per i vitelli di età compresa tra 1 e 7 mesi, con un peso-carcassa inferiore a 160 kg (50 euro per capo). Per poter ricevere il contributo è necessario che l'animale sia stato detenuto in azienda per almeno 2 mesi.

Agenda 2000 istituisce anche un sistema di rintracciabilità per la sicurezza alimentare del consumatore (Regolamento CE 1760/00), prevedendo un sistema di etichettatura obbligatorio per le carni bovine che consenta di determinare la storia del prodotto lungo tutta la filiera. Vengono raccolte tutte le informazioni che consentano al consumatore al momento dell'acquisto di risalire ai luoghi di macellazione, di allevamento e di nascita dell'animale. Un sistema che parte dall'applicazione in Italia degli atti 6, 7, 8 sopra citati, e introdotti dal gennaio 2005 col Decreto del Ministro delle Politiche Agricole e Forestali del 13 dicembre 2004 relativamente alla sanità pubblica e alla salute degli animali. Si tratta di un sistema di identificazione degli animali con marche auricolari, passaporti rilasciati dalle Unità Sanitarie Locali e successiva iscrizione all'anagrafe nazionale.

Il disaccoppiamento dei premi relativi alla produzione di carne bovina è avvenuto nel 2005. Il meccanismo di attribuzione dei diritti relativi a questo tipo di produzione è avvenuto come per i seminativi facendo riferimento ai premi zootecnici percepiti dall'azienda nel triennio di riferimento 2000/2002. In particolare però, si è considerato il numero di capi medio ammessi a premio nel triennio, moltiplicando poi tale numero per gli importi pro-capo validi nel 2002. La cifra così ottenuta è andata ad incrementare il valore dei titoli per ettaro di riferimento.

Se l'azienda in oggetto invece non ha superfici a disposizione il regolamento consente comunque l'assegnazione di titoli speciali che possono essere conservati purchè si dimostri di continuare a svolgere attività di allevamento (nella fattispecie almeno il 50% delle UBA presenti in azienda nel triennio 2000/2002).

È previsto anche un pagamento supplementare regolamentato dall'art. 69 del regolamento. Tale articolo prevede infatti che ogni stato membro possa trattenere fino a un massimo del 10% dai PUA, per costituire un fondo che serva poi ad incentivare determinate produzioni secondo le finalità generali del regolamento (qualità, ambiente e commercializzazione dei prodotti). L'Italia attraverso il DM 1787/2004 ha stabilito le ritenute da effettuare per la costituzione di tale fondo, trattenendo dai Pagamenti Unici Aziendali il 7% relativamente alle carni bovine, il 5% per le carni ovicaprine e l'8% per il settore dei seminativi (4).

L'erogazione del contributo supplementare per le carni bovine avviene sulla base del numero di capi allevati e nel rispetto dei criteri di ammissibilità previsti dal medesimo articolo 69, (vacche nutrici, basso carico di bestiame, pascolo, macellazione di animali etichettati o biologici). In particolare vengono posti dei limiti all'intensità dell'allevamento sia per le vacche a duplice attitudine che per le vacche nutrici non iscritte nei libri genealogici, (pari a 1,4 UBA per ettaro di SAU foraggera e l'obbligo di pascolo permanente per almeno il 50% della superficie foraggera). Il premio di macellazione viene erogato ai capi bovini macellati da 1 anno a 26 mesi

dalla nascita e presenti in azienda da almeno 7 mesi, allevati nel rispetto di un disciplinare di etichettatura volontaria, o secondo i Regolamenti (CE) 1804/99 (metodo biologico) e (CEE) 2081/92 (produzioni IGP). Il premio unitario massimo ammissibile è di 180 euro per capo.

2.5 Altri regimi di aiuto

Parallelamente al regime di pagamento unico rimangono alcuni aiuti specifici per determinate produzioni. Questi sono contemplati al Titolo IV del regolamento. Si tratta di una serie di sostegni relativi a determinati settori, che rimangono accoppiati alle produzioni

Grano duro

Il primo di questi aiuti è per le produzioni di frumento duro di qualità. L'erogazione dei pagamenti è subordinata all'utilizzazione di un determinato quantitativo di sementi certificate di varietà riconosciute, nella zona di produzione, come varietà di alta qualità. La superficie massima ammissibile per singolo paese è stabilita dall'articolo 74 e per l'Italia risulta essere la più estesa di tutti i paesi europei (1.646.000 ettari); la Grecia che viene dopo di noi dispone di una superficie nettamente inferiore, circa 617 mila ettari. Questo la dice lunga dell'importanza di questa coltura per il nostro paese. Chiaramente per l'Italia le superfici ammissibili si trovano tutte nelle regioni del Sud e del Centro, come specificato nell'allegato X del regolamento. Il premio è pari a 40 euro per ettaro posto a coltura e debbono essere utilizzati almeno 180 Kg/ha di semente.

Oltre questo premio è possibile richiedere anche un pagamento supplementare (secondo l'articolo 69) che non può essere superiore a 180 euro per ettaro e si determina ogni anno sulla base della disponibilità nazionale relativa ai seminativi.

Colture proteiche

Il Premio per le colture proteiche, è concesso agli agricoltori che producono a condizioni specificate nel regolamento. Sono relativi a:

- piselli
- fave, favette
- lupini

L'importo ammonta a 55,57 euro per ettaro. È fissata una superficie massima da mettere a coltura pari per l'Italia a 1.600.000 ettari. Esiste anche per questi produttori la possibilità di richiedere un pagamento supplementare secondo l'articolo 69, a condizione che siano utilizzate sementi certificate; l'importo non può superare i 180 euro per ettaro e viene annualmente determinato sulla base della disponibilità nazionale relativa ai seminativi.

Altri seminativi

Tutti i produttori di cereali (grano tenero, orzo, mais ecc.), oleaginose (soia, colza, girasole) lino e canapa possono comunque fare domanda per il pagamento supplementare disposto dall'articolo 69, se fanno uso di sementi certificate di varietà

riconosciute, secondo determinate quantità.

Riso

Anche per il riso viene mantenuto un'aiuto a ettaro sulla base delle rese per ettaro registrate negli Stati membri interessati secondo quanto specificato all'articolo 80. Anche in questo caso è fissata una superficie di base nazionale per ciascuno Stato. L'Italia dispone della potenzialità produttiva (219.588 ettari) maggiore all'interno dell'Unione, più del doppio rispetto al Paese che segue la Spagna (104.493 ettari). L'aiuto per ettaro è pari a 453 euro.

Colture energetiche

Per le colture energetiche si prevede un aiuto pari a 45 euro per ettaro per le superfici seminate e destinate alla produzione di biocarburanti così come definito dalla Direttiva 2003/30/CE, oppure destinate alla produzione di biomasse per la produzione di energia termica (biogas). Anche in questo caso viene fissata una superficie massima di 1.500.000 ettari per la quale può essere concesso l'aiuto.

Foraggi essiccati

Relativamente ai foraggi essiccati, dal 2005, è previsto un aiuto per l'industria di trasformazione che abbia stipulato un contratto con gli agricoltori. Il contributo viene erogato nella misura di 33 euro per tonnellata di foraggio disidratato, per un quantitativo massimo di 685.000 tonnellate, e risulta essere meno della metà di quello pagato prima delle riforme. Infatti parte dell'aiuto viene disaccoppiato e rimane ad appannaggio dei produttori storici che hanno consegnato foraggio all'industria nel triennio 2000/2002. Si tratta di 26,19 euro per tonnellata per i foraggi disidratati e 18 euro per tonnellata per i foraggi essiccati al sole. L'importo da disaccoppiare per il produttore viene calcolato sulla base dei quantitativi consegnati nel triennio (che risultano dai contratti con l'industria), e tenendo conto dei massimali nazionali disponibili.

Barbabietola da zucchero

Per questo settore produttivo il disaccoppiamento è avvenuto nel corso di quest'anno, ma con ritardo rispetto a quanto descritto per il latte. Infatti la fissazione dei titoli provvisori è avvenuta solo a giugno sulla base dei Regolamenti (CE) 318-319-320/06 e dei Decreti Ministeriali DM/256 del 28/4/2006 e DM/271 del 4/5/2006. Il periodo di riferimento considerato per il calcolo dei diritti è il triennio 2000-2002 come per seminativi e riso. La determinazione dell'importo di riferimento si ottiene partendo dal saccarosio prodotto nel triennio dall'azienda ed applicando una ritenuta pari all'8% destinata al pagamento accoppiato previsto dall'articolo 69. La superficie di riferimento invece viene stabilita sulla base delle rese medie produttive provinciali registrate da Istat, dividendo la produzione di barbabietola dell'azienda per la resa Istat di quella zona di produzione in quell'anno. A fronte di una riduzione del 36 % in 4 anni del prezzo garantito, i produttori otterranno una compensazione pari a circa il 64% della riduzione di prezzo, sotto forma di aiuto disaccoppiato. Inoltre verrà corrisposto un ulteriore aiuto pari al 30 % della perdita di reddito avuta dai

produttori per un periodo temporaneo di cinque anni, in cambio del quale l'Italia ha dovuto rinunciare volontariamente a circa il 50% della sua quota produttiva. Dunque l'applicazione del disaccoppiamento per questo settore avviene con un prezzo abbastanza alto da pagare in termini di quota produttiva per i bieticoltori italiani. Parallelamente alla riduzione delle superfici seminate, dovrebbe realizzarsi anche la riduzione del numero degli impianti di lavorazione attivi (da 19 a 6), fatta salva la possibilità di avviare un processo di riconversione verso la produzione di agroenergia, così come previsto a livello comunitario, beneficiando di un apposito "Fondo per la razionalizzazione e la riconversione della produzione bieticola-saccarifera".

Olivo e tabacco

Il Regolamento (CE) 864/04, che modifica il Regolamento (CE) 1782/03, allarga il regime di pagamento unico, ai settori dell'olio d'oliva e del tabacco, ad iniziare dal 2006. Per l'olio d'oliva, l'Italia ha deciso di optare per il disaccoppiamento totale degli aiuti basandosi sui contributi percepiti dal produttore nel quadriennio 1999-2002 (3). Agea ha provveduto all'assegnazione dei titoli provvisori già dall'aprile del 2006: i produttori hanno così potuto presentare domanda di fissazione entro il 15 maggio successivo. Per il tabacco invece viene previsto un periodo transitorio dal 2006 al 2009 con disaccoppiamento del 40% dell'aiuto, mentre il restante 60% rimarrà accoppiato. Il disaccoppiamento totale avverrà solo a partire dal 2010. Il periodo di riferimento per il calcolo dei titoli è il triennio 2000-2002.

3. Lo sviluppo rurale

Nel giugno del 2005 si è concluso a livello comunitario il percorso di riforma delle politiche di sviluppo rurale per il periodo 2007-2013 con l'approvazione da parte del Consiglio Europeo del Regolamento (CE) 1698/05 sullo sviluppo rurale.

Si è trattato di un percorso iniziato già nel 2004 che ha visto diverse fasi e che ha portato all'aumento delle risorse a disposizione di questo strumento di politica agricola comunitaria e alla semplificazione delle pratiche di partecipazione al fondo. Infatti il finanziamento del piano avviene attraverso un unico fondo: il Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale (FEASR) che deriva dalle sezioni orientamento e garanzia del FEOGA.

Le novità introdotte dal nuovo regolamento sullo sviluppo rurale riguardano in particolare la *programmazione e gestione degli interventi* che avviene attraverso l'adozione di un piano strategico comunitario che fornisce chiare indicazioni (linee guida) ai singoli stati membri per la costruzione di un Piano strategico nazionale (PSN), nuovo utile strumento che individua le priorità e coordina le strategie regionali. Vengono anche intensificati il monitoraggio e la valutazione degli interventi finanziati (3).

Per quel che concerne gli *obiettivi prioritari* sono 3 che corrispondono ad altrettanti assi:

ASSE I - Competitività del settore agricolo e forestale.

ASSE II - Gestione ambientale.

ASSE III - Diversificazione economica delle aree rurali e qualità della vita.

L'Asse I riguarda i finanziamenti relativi alle risorse umane (insediamento giovani, prepensionamento, formazione e informazione, avvio e utilizzo dei servizi di consulenza), alla trasformazione delle aziende, alla commercializzazione dei prodotti, alla cooperazione tra gli attori della filiera agroalimentare. Inoltre sarà incentivata la qualità agroalimentare (aiuti per l'adeguamento agli standard comunitari e la partecipazione a sistemi di qualità, informazione e promozione sui prodotti agricoli di qualità).

A livello regionale il piano proposto recepisce le indicazioni del PSN e per quanto riguarda l'Asse I l'obiettivo è quello di sostenere la componente agricola in grado di creare reddito e di concorrere alla crescita economica e sostenibile del territorio. Lo sguardo è rivolto alle imprese in grado di impegnarsi nella innovazione produttiva, organizzativa e commerciale per rispondere alle nuove esigenze del mercato globale. La logica progettuale applicata privilegia un approccio di filiera, che coinvolge soggetti che operano in differenti livelli di produzione o un approccio collettivo, che coinvolge categorie di soggetti omogenei.

In particolare per le produzioni animali vengono individuate diverse filiere:

Filiere a valenza regionale

- a) filiera lattiero casearia: latte alimentare e latticini freschi;
- b) filiera lattiero casearia: formaggi stagionati a denominazione d'origine protetta;
- c) filiera carne bovina;
- d) filiera suinicola;
- e) filiera avicola e uova.

Filiere a valenza locale

- a) *filiera ovi-caprina*;
- b) filiera cunicola;
- c) filiere di zootecnia minore: api, avicoli di nicchia, bufali, equidi, selvaggina, struzzi, ecc.

L'Asse II riguarda lo sviluppo rurale, il miglioramento dell'ambiente e del territorio e comprende diverse misure per l'uso sostenibile del territorio agricolo:

- pagamenti agroambientali e per il benessere degli animali;
- sostegno ad investimenti non produttivi necessari ad assicurare il rispetto degli impegni previsti nelle misure agroambientali;
- indennità per le aree montane e le altre zone svantaggiate;
- indennità per le aree soggette a vincolo ambientale;
- indennità per l'uso sostenibile delle aree forestali (imboschimento delle superfici agricole, primo impianto di sistemi agroforestali su terreni agricoli, imboschimento di superfici non agricole).

L'Asse III ha l'obiettivo di promuovere l'ambiente rurale e una strategia di

sviluppo integrato che mostri il ruolo polifunzionale dell'agricoltura, attraverso la riorganizzazione dei fattori produttivi aziendali, verso attività complementari a quella primaria di produzione alimentare valorizzando le funzioni economiche, sociali ed ambientali (diversificazione delle attività agricole, incentivazione di attività turistiche, sostegno alla creazione e allo sviluppo di microimprese non solo artigiane).

La strategia si basa inoltre su interventi per la tutela e la riqualificazione del patrimonio rurale nonché sullo sviluppo di iniziative di valorizzazione delle emergenze naturalistiche e delle eccellenze agricole ed enogastronomiche del territorio.

Dunque una serie di nuove opportunità si aprono per la ristrutturazione e la pianificazione delle aziende zootecniche della pianura padana. Tali finanziamenti, nello spirito del regolamento e delle direttive comunitarie, dovranno servire a dare nuovi impulsi alle attività produttive primarie e a quelle complementari, e non soltanto, come spesso è accaduto in passato, a dare reddito senza generare lo sviluppo di nuove attività o il miglioramento qualitativo delle produzioni.

4. Conclusioni

L'introduzione della riforma di medio termine della PAC porterà indubbiamente cambiamenti per le aziende agricole zootecniche. La possibilità di ricevere il pagamento unico aziendale, indipendentemente da scelte colturali e produttive e il momento congiunturale difficile caratterizzato da prezzi bassi per molte produzioni agricole della nostra provincia, primo tra tutti il Parmigiano-Reggiano, sarà di stimolo e di riflessione per gli imprenditori agricoli. Alcuni potrebbero essere incoraggiati ad abbandonare l'attività produttiva soprattutto nelle zone svantaggiate e marginali, con gravi conseguenze sul dissesto idrogeologico e la tutela del territorio.

Infatti essendo l'aiuto calcolato sulla media dei contributi percepiti per ettaro nel triennio di riferimento, i diritti acquisiti in queste zone risultano più bassi di altri in quanto tengono conto delle rese storiche delle aree di produzione. L'abbassamento dei prezzi dei prodotti agricoli e la riduzione dell'aiuto ad effetto della modulazione potrebbero stimolare gli agricoltori delle zone più marginali all'abbandono di queste. L'abbandono della produzione significa in molti casi anche spopolamento delle campagne con una inevitabile perdita di posti di lavoro. Dall'altra parte però il disaccoppiamento, si è detto, libera l'agricoltore da scelte produttive condizionate dalla percezione del contributo e, quindi, potrebbe aprire nuove prospettive, grazie anche ai finanziamenti previsti dalla normativa di sviluppo rurale tesi a migliorare la qualità delle produzioni.

Visto il mercato globale e la diminuzione costante dei prezzi dei prodotti agricoli, le opportunità offerte dal Pua e dai nuovi finanziamenti per lo sviluppo rurale dovrebbero permettere di apportare innovazione in un settore quello agricolo spesso poco consono a mutamenti, ma che rischia di essere schiacciato nella morsa tra costi che salgono e prezzi che scendono. Ancora, potrebbero esserci forti ripercussioni sul mercato fondiario e su quello degli affitti: infatti, il diritto a percepire l'aiuto apparterrebbe a chi effettivamente coltivava la terra nel periodo di riferimento, per cui vi saranno terreni con diritto e terreni senza diritto. Dal punto di vista del rinnovamento del sistema imprenditoriale, l'istituzione del Pua riferito ai produttori

storici costituisce un'altra "barriera all'entrata" per i giovani agricoltori che volessero entrare nel settore e dovranno prima "acquistare" i diritti, pagando quindi di più la terra o il canone di affitto.

Particolare è il caso delle aziende zootecniche produttrici di latte, cui a partire dall'annata in corso sarà attribuito il premio per la produzione di latte all'interno del Pua. Infatti si potrebbe assistere, in alcune circostanze, a dismissioni di attività produttive, pur mantenendo un'attività minima di lavorazione dei suoli (per garantirsi il pagamento dell'aiuto disaccoppiato). Questo potrebbe essere vero soprattutto per quei conduttori più anziani che dismettendo l'attività di allevamento vedrebbero alleggerito il proprio carico di lavoro, senza perdere l'aiuto comunitario che potrebbe rappresentare per loro una sorta di pensione integrativa. Infatti la sola coltivazione degli ettari corrispondenti ai diritti acquisiti nel 2006 col disaccoppiamento del settore lattiero caseario, potrà consentire il percepimento di un aiuto importante (circa 3,3 euro al quintale di latte prodotto) senza di fatto dover necessariamente continuare a produrre latte. Partendo dai pagamenti effettuati da Agrea dell'Emilia-Romagna ai produttori di latte per l'annata 2005, e ipotizzando una situazione analoga di produzione per l'annata 2006, il contributo medio derivante dal latte in provincia di Parma dovrebbe aggirarsi intorno a 10.000 euro per azienda nella stessa annata.

Bibliografia

1. FRASCARELLI A. (2005). La riforma della PAC - Anno II. *Terra e Vita* supplemento al n. 44.
2. GARGANO N., SARDONE R. (2004). Multifunzionalità e ambiente in Inea - *Verso il riconoscimento di un'agricoltura multifunzionale*. Edizioni scientifiche Italiane, Napoli.
3. INEA (2006). Le politiche agricole dell'Unione Europea, Rapporto 2004-05. *Osservatorio sulle politiche agricole dell'UE*. (<http://www.inea.it/opaue>) INEA - LG, Roma.
4. PAMPANINI R. (2006). Ruolo dell'agricoltura nelle economie mature. Relazione presentata al XLIII Convegno SIDEA su: *Agricoltura e mercati in transizione*. Assisi, 7-9 settembre.
- 5) PRETOLANI R. (2004). Contenuti e problematiche della riforma in IreR - *Riforma della PAC e impatto sul sistema agricolo lombardo. Rapporto finale*, Milano.
- 6) VELASQUEZ B.E., PIERANGELI F (2004). L'approccio alla multifunzionalità in ambito europeo in Inea - *Verso il riconoscimento di un'agricoltura multifunzionale*. Edizioni scientifiche Italiane, Napoli.

“CULATELLO DI ZIBELLO” DOP, PRODUZIONE E ATTIVITÀ DI CONTROLLO

Giuseppe Bonazzi¹

PAROLE CHIAVE:

Culatello di Zibello, Controlli DOP, Qualità e sicurezza alimentare.

KEY WORDS:

Culatello di Zibello, PDO controls, Quality and food safety.

Sommario

La coscia posteriore del suino è valorizzata in provincia di Parma nel territorio a sud della via Emilia, pedecolle e collina fino a 900 metri di altitudine s.l.m., con la lavorazione del Prosciutto di Parma DOP, mentre nel territorio a nord, quello limitrofo al fiume Po, in ambiente con clima più umido nella bassa pianura, con la lavorazione del Culatello di Zibello DOP. Nel 1996 il culatello ha ottenuto il marchio DOP sulla base della normativa europea contenuta nel Reg. CEE 2081/92 ed il riconoscimento del Reg. (CE) N. 1107/96. L'attività di controllo per l'apposizione del marchio DOP viene svolta dall'Istituto Parma Qualità. L'attività si sostanzia in un insieme di controlli e di verifiche di conformità dell'allevamento, della macellazione e della produzione del culatello, al fine di garantire la tracciabilità e l'osservanza del disciplinare di produzione in tutte le fasi della filiera.

Il comparto ha avuto un forte sviluppo ed è alla ricerca di un assetto maggiormente stabile in particolare per le imprese di maggiore dimensione in quanto da una caratterizzazione di imprese prevalentemente artigianali di piccole dimensioni, con poche centinaia di culatelli prodotti solo nel periodo autunnale e invernale, ha visto affermarsi anche una produzione in imprese di più ampie dimensioni con produzione anche in altri periodi dell'anno.

Abstract

The pig's back leg is used to produce Parma Ham, that is a Pdo food produced in Parma, in the southern part of the province, from Via Emilia to 900 meter above sea level. Moreover, the pig's back leg is used to produce Culatello di Zibello, that is a Pdo food produced even in Parma, in the northern part of the province, near Po river, in a wet climate that characterize this low land. During 1996 Culatello di Zibello has obtained Pdo mark, by European Reg. CEE 2081/92 and recognized by Reg. (CE) N. 1107/96. Control activity about Pdo mark is issued by Istituto Parma

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

Qualità. That activity realises control about breeding, about butchering and about the whole production. This complex of control have the aim to guarantee the tracking of production and the compliance of production disciplinary in all culatello chain passages.

The culatello sector has achieved a high growth rate and it's now seeking a steady state. That is encouraged by a transition of the sector, that was characterized in the past by a lot a of small artisan company producing a few century Culatello di Zibello in autumn and winter. In recent year a certain number of greater companies has arrived in the market, and these are characterized by a whole year production cycle.

Premessa

Nel 2005 la produzione italiana di salumi è stata di 1,148 milioni di tonnellate per un valore complessivo di 7.150 milioni di Euro. Prosciutto cotto e prosciutto crudo continuano a rappresentare quasi la metà della produzione nazionale di salumi, 48,1% della quantità e 51,0% del valore nel 2005. Sempre nel 2005 il prosciutto crudo rappresenta il 23,8% della quantità prodotta ed il 27% del valore, mentre il prosciutto cotto rappresenta il 24,3% della quantità e il 24% del valore. Per quantità prodotta seguono mortadella 14,9% e salame 9,3%, gli altri salumi hanno produzioni più contenute.

Tabella 1: Produzione italiana di salumi in quantità e in valore (Anni 2004 - 2005)

	2004	2004	2005	2005	2004	2004	2005	2005
Salumi	(.000t)	%	(.000t)	%	(mln euro)	%	(mln euro)	%
Prosciutto cotto	282,7	24,5%	279,6	24,3%	1.710,0	24,0%	1.715,0	24,0%
Prosciutto crudo	271,5	23,6%	272,8	23,8%	1.952,0	27,4%	1.931,0	27,0%
Mortadella	171,9	14,9%	170,8	14,9%	640,0	9,0%	635,0	8,9%
Salame	107	9,3%	107,2	9,3%	854,0	12,0%	865,0	12,1%
Pancetta	53	4,6%	58,3	5,1%	231,0	3,2%	201,0	2,8%
Wurstel	57,1	5,0%	51,7	4,5%	197,0	2,8%	231,0	3,2%
Coppa	43,8	3,8%	42,7	3,7%	294,0	4,1%	294,0	4,1%
Speck	27,5	2,4%	27,5	2,4%	259,0	3,6%	259,0	3,6%
Bresaola	16,2	1,4%	16,8	1,5%	195,0	2,7%	212,0	3,0%
Altri prodotti	121,5	10,5%	120,4	10,5%	804,0	11,2%	807,0	11,3%
Totale	1.152,20	100,0%	1.147,80	100,0%	7.136,0	100,0%	7.150,0	100,0%

Fonte: Assica

All'interno della produzione italiana di salumi, in una strategia di differenziazione delle produzioni un ruolo rilevante vengono ad avere le Denominazioni d'Origine Protette (DOP) e le Indicazioni Geografiche Protette (IGP).

Il Reg. (CEE) n. 2081/92 intende per “denominazione d’origine” il nome di una regione, di un luogo determinato o, in casi eccezionali, di un paese che serve a designare un prodotto agricolo o alimentare originario di tale regione, di tale luogo determinato o di tale paese e la cui qualità o le cui caratteristiche siano dovute essenzialmente o esclusivamente all’ambiente geografico comprensivo dei fattori naturali ed umani e la cui produzione, trasformazione ed elaborazione avvengano nell’area geografica delimitata.

Il Reg. CEE 2081/92 intende per “indicazione geografica” il nome di una regione, di un luogo determinato o, in casi eccezionali, di un paese che serve a designare un prodotto agricolo o alimentare originario di tale regione, di tale luogo determinato o di tale paese e di cui una determinata qualità, la reputazione o un’altra caratteristica possa essere attribuita all’origine geografica e la cui produzione e/o trasformazione e/o elaborazione avvengano nell’area geografica determinata.

Questo Regolamento viene così a tutelare le produzioni regionali favorendo la diversificazione e la qualità della produzione individuata dal disciplinare di produzione adottato, risulta un sostegno alle iniziative commerciali dei produttori proteggendoli da abusi o usurpazioni e contemporaneamente permette una informazione sul prodotto ai consumatori circa l’origine delle produzioni.

In Italia le strutture di controllo aventi il compito di garantire che i prodotti agricoli e alimentari recanti una Denominazione Protetta rispondano ai requisiti del Disciplinare previsti dal Reg. (CEE) n. 2081/92 art. 10 sono gli Organismi di Controllo iscritti in un apposito Albo del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali che operano in qualità di incaricati di pubblico servizio secondo i principi di indipendenza e terzietà, in conformità alla norma europea EN 45011 con il coordinamento e la vigilanza del Ministero. Separate sono quindi le funzioni degli Organismi di Tutela da quelle degli Organismi di Controllo.

Sulla base della normativa sopra indicata vengono prodotti oggi nella UE 77 prodotti a base di carne, 25 DOP e 52 IGP, i prodotti italiani rappresentano il 36% del totale pari a 28 denominazioni tutelate, 20 DOP e 8 IGP. Per numerosità di prodotti tutelati seguono Portogallo (21), Spagna (10) e Germania (8).

Tabella 2: Numero di prodotti a base di carne DOP e IGP per paese nella UE (Anno 2006)

Paesi	DOP	IGP	Totale
Italia	20	8	28
Portogallo	1	20	21
Spagna	4	6	10
Germania	0	8	8
Francia	0	4	4
Austria	0	2	2
Belgio	0	2	2
Irlanda	0	1	1
Lussemburgo	0	1	1
Totale	25	52	77

Fonte: Unione Europea

In Italia per i 28 prodotti a base di carne tutelati DOP e IGP operano 8 diversi Organismi di Controllo, alcuni come INEQ, IPQ, ICQ ecc. operano su più prodotti di carne tutelati, altri svolgono la loro attività di controllo su un solo prodotto a base di carne. Ciascun prodotto tutelato ha uno o più Organismi di Tutela, organizzati in forma di consorzio, cooperativa, istituto, associazione o comitato.

Tabella 3: Prodotti a base di carne DOP e IGP, Organismi di Controllo e Organismi di Tutela (Anno 2006)

Denominazione	Protezione	Organismo di Controllo	Organismo di Tutela
Bresaola della Valtellina	IGP	CSQA Certificazioni di Qualità e Ambientali - Thiene (VI)	Consorzio per la Tutela del nome Bresaola della Valtellina
Capocollo di Calabria	DOP	ICQ Istituto Calabria Qualità - Cosenza	Cooperativa Zootecnica Agricola Cosentina a r.l. - CO.Z.A.C.
Coppa Piacentina	DOP	E.CE.P.A. Ente Certificazione Prodotti Agro-Alimentari - Piacenza	Consorzio Salumi Tipici Piacentini
Cotechino di Modena	IGP	INEQ Istituto Nord Est Qualità - San Daniele del Friuli (UD)	I.S.I.T. Istituto Salumi Italiani Tutelati
Culatello di Zibello	DOP	IPQ Istituto Parma Qualità - Langhirano (PR)	Consorzio del Culatello di Zibello
Lardo di Colonnata	IGP	Agroqualità - Roma	Associazione di Tutela del Lardo di Colonnata
Mortadella di Bologna	IGP	INEQ Istituto Nord Est Qualità - San Daniele del Friuli (UD)	I.S.I.T. Istituto Salumi Italiani Tutelati e Consorzio Mortadella Bologna
Pancetta di Calabria	DOP	ICQ Istituto Calabria Qualità - Cosenza	Cooperativa Zootecnica Agricola Cosentina a r.l. - CO.Z.A.C.
Pancetta Piacentina	DOP	E.CE.P.A. Ente Certificazione Prodotti Agro-Alimentari - Piacenza	Consorzio Salumi Tipici Piacentini
Prosciutto di Carpegna	DOP	INEQ Istituto Nord Est Qualità - San Daniele del Friuli (UD)	Consorzio di Tutela del Prosciutto di Carpegna
Prosciutto di Modena	DOP	IPQ Istituto Parma Qualità - Langhirano (PR)	Consorzio del Prosciutto di Modena
Prosciutto di Norcia	IGP	3A Parco Tecnologico Agroalimentare dell'Umbria - Todi (PG)	Consorzio di Tutela del Prosciutto di Norcia
Prosciutto di Parma	DOP	IPQ Istituto Parma Qualità - Langhirano (PR)	Consorzio Prosciutto di Parma
Prosciutto di San Daniele	DOP	INEQ Istituto Nord Est Qualità - San Daniele del Friuli (UD)	Consorzio del Prosciutto di San Daniele
Prosciutto di Veneto Berico-Euganeo	DOP	INEQ Istituto Nord Est Qualità - San Daniele del Friuli (UD)	Consorzio del Prosciutto Veneto Berico Euganeo
Prosciutto Toscano	DOP	INEQ Istituto Nord Est Qualità - San Daniele del Friuli (UD)	Consorzio del Prosciutto Toscano
Salame Brianza	DOP	INEQ Istituto Nord Est Qualità - San Daniele del Friuli (UD)	Consorzio Salame Brianza

Salame Varzi	DOP	IPQ Istituto Parma Qualità - Langhirano (PR)	Consorzio di Tutela Salame di Varzi
Salame d'oca di Mortara	IGP	CERTIQUALITY Istituto di Certificazione della Qualità - Milano	Consorzio di Tutela del Salame d'Oca di Mortara
Salame Piacentino	DOP	E.CE.P.A. Ente Certificazione Prodotti Agro-Alimentari - Piacenza	Consorzio Salumi Tipici Piacentini
Salamini italiani alla cacciatora	DOP	INEQ Istituto Nord Est Qualità - San Daniele del Friuli (UD)	I.S.I.T. Istituto Salumi Italiani Tutelati e Consorzio Salamini Italiani alla Cacciatora - DOP
Salsiccia di Calabria	DOP	ICQ Istituto Calabria Qualità - Cosenza	Cooperativa Zootecnica Agricola Cosentina a r.l. - CO.Z.A.C.
Sopressata di Calabria	DOP	ICQ Istituto Calabria Qualità - Cosenza	Cooperativa Zootecnica Agricola Cosentina a r.l. - CO.Z.A.C.
Sopressata Vicentina	DOP	INEQ Istituto Nord Est Qualità - San Daniele del Friuli (UD)	Consorzio di Tutela della Denominazione di Origine Protetta Soppressa Vicentina
Speck dell'Alto Adige	IGP	INEQ Istituto Nord Est Qualità - San Daniele del Friuli (UD)	Consorzio Speck Alto Adige
Valle d'Aosta Jambon de Bosses	DOP	INEQ Istituto Nord Est Qualità - San Daniele del Friuli (UD)	Cooperativa Jambon de Bosses
Valle d'Aosta Lard d'Arnad	DOP	INEQ Istituto Nord Est Qualità - San Daniele del Friuli (UD)	Comité pour la valorisation des produits typiques d'Arnad
Zampone di Modena	IGP	INEQ Istituto Nord Est Qualità - San Daniele del Friuli (UD)	I.S.I.T. Istituto Salumi Italiani Tutelati

Fonte: Unione Europea e nostre elaborazioni

Inoltre vengono prodotti oggi nella UE 101 prodotti indicati carne fresca (e frattaglie), 22 DOP e 79 IGP, in questo caso particolarmente presenti in Francia (50), Portogallo (25) e Spagna (13).

Tabella 4: Numero di prodotti carne fresca (e frattaglie) DOP e IGP per paese nella UE (Anno 2006)

Paesi	DOP	IGP	Totale
Francia	3	47	50
Portogallo	14	11	25
Spagna		13	13
Regno Unito	3	4	7
Germania	2	1	3
Italia		2	2
Lussemburgo		1	1
Totale	22	79	101

Fonte: Unione Europea

In Italia sono presenti solo due prodotti di carne fresca tutelati: Agnello di Sardegna (IGP) e Vitellone Bianco dell'Appennino Centrale (IGP).

Tabella 5: Prodotti carne fresca (e frattaglie) DOP e IGP, Organismi di Controllo e Organismi di Tutela (Anno 2006)

Denominazione	Protezione	Organismo di Controllo	Organismo di Tutela
Agnello di Sardegna	IGP	CON.T.A.S. Consorzio Tutela Agnello di Sardegna	Consorzio Volontario per la Tutela I.G.P. Agnello di Sardegna
Vitellone Bianco dell'Appennino centrale	IGP	3A Parco Tecnologico Agroalimentare dell'Umbria Soc. Cons. a r. l.	Consorzio di Tutela del Vitellone Bianco dell'Appennino Centrale Igp

Fonte: Unione Europea

Culatello di Zibello DOP

La provincia di Parma vanta un ruolo rilevante nel comparto della lavorazione delle carni per la produzione di salumi, in particolare per la produzione del prosciutto (circa 19 milioni di pezzi nel 2005) nella quale emerge la produzione del Prosciutto di Parma DOP (9,8 milioni di pezzi nel 2005) con una produzione che copre il 40% circa del mercato nazionale. Oltre al Prosciutto di Parma nella provincia si ha la produzione di altri salumi tipici tra cui il Culatello di Zibello DOP ed altri che attendono di avere riconoscimenti di denominazioni di origine quali Salame di Felino, Coppa di Parma, Spalla cruda di Palasone e Spalla cotta di San Secondo.

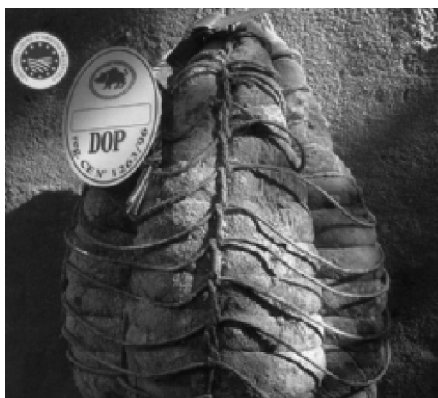
Il Culatello di Zibello è un prodotto a Denominazione di Origine Protetta (DOP), secondo il Reg. (CEE) n. 2081/92 e riconoscimento del Reg. (CE) n. 1107/96. Il Disciplinare di Produzione della DOP Culatello di Zibello individua la zona di produzione del culatello in provincia di Parma, nel territorio limitrofo al fiume Po, nei Comuni di Polesine Parmense, Busseto, Zibello, Soragna, Roccabianca, San Secondo, Sissa e Colorno. Per la produzione devono essere utilizzate le cosce dei suini nati, allevati e macellati solo nelle regioni Lombardia ed Emilia-Romagna secondo le prescrizioni stabilite per la materia prima dei Prosciutti di Parma e di San Daniele che devono possedere le caratteristiche proprie del suino pesante italiano, definite ai sensi del Reg. (CE) n. 3220/84. La materia prima è costituita dalla parte anatomica del fascio di muscoli crurali posteriori ed interni della coscia del suino, opportunamente mondati in superficie e rifilati sino ad ottenere la classica forma a "pera".

Il Culatello di Zibello è pertanto ottenuto dagli arti posteriori del suino, sgrassati e privati della cotenna, isolando la massa muscolare che si trova intorno al femore. La parte anteriore del taglio è destinata alla preparazione del "fiocchetto", altra pregiata produzione tipica locale. La massa muscolare viene salata manualmente a secco e posta in cella frigorifera ad una temperatura fra 0° C e 5° C fino al completo assorbimento del sale. Successivamente i culatelli sono posti in cella di riposo per poi essere insaccati in budelli naturali utilizzando vescica suina o peritoneo parietale e perirenale di suino, l'operazione consiste nell'avvolgere il culatello nella vescica urinaria del maiale, a cui segue la legatura con dei giri di spago che procedono a spi-

rale dalla base all'apice intersecando con altri giri di spago disposti in senso verticale. La legatura o immagliatura del prodotto fresco è finalizzata ad evitare che all'interno del culatello rimangano vuoti d'aria. Segue la sgocciolatura delle masse muscolari per circa una settimana e l'asciugatura che può variare da 30 a 60 giorni in funzione delle condizioni climatiche. Si ha quindi la fase di stagionatura, la cui durata non deve essere inferiore ai 10 mesi. La stagionatura deve essere condotta in locali ove sia assicurato un sufficiente ricambio dell'aria a una temperatura compresa tra 13° C e 17° C. Durante tale periodo è consentita la ventilazione, l'esposizione alla luce ed all'umidità naturale tenuto conto dei fattori climatici presenti nella zona tipica di produzione. Nel complesso l'assorbimento di sale è inferiore al 2,8% del peso del culatello; il calo del culatello stagionato è del 2% dopo la salatura, del 35% a sei mesi e del 40% a 12 mesi di stagionatura.

Al termine del periodo minimo di stagionatura, che è di 10 mesi, il Culatello di Zibello deve presentare un peso compreso tra i 3 ed i 5 kg e, all'atto dell'immissione al consumo, avere forma a "pera" con leggero strato di grasso nella parte convessa, imbrigliato in giri di spago tali da formare una rete a maglie larghe. Al taglio la frazione muscolare si deve presentare di colore rosso uniforme ed il grasso compreso tra i diversi fasci muscolari si deve presentare di colore bianco, deve inoltre presentare odore dal profumo intenso e caratteristico e il sapore dal gusto tipico, dolce e delicato.

Figura 1: Culatello di Zibello DOP marchiato



Fonte: Istituto Parma Qualità

All'interno della DOP Culatello di Zibello un gruppo di imprese si è dato un disciplinare più restrittivo di quello adottato dalla DOP stessa e ha costituito il Consorzio del Culatello di Zibello. Il culatello che viene prodotto dai produttori che hanno aderito al Consorzio può essere prodotto solo nei mesi autunnali e invernali, tra ottobre e febbraio e deve essere stagionato senza l'ausilio di impianti di refrigerazione, oltre al marchio DOP viene apposto il marchio del Consorzio del Culatello di Zibello.

Attività di controllo

L'Istituto Parma Qualità (IPQ) è l'organismo che svolge le funzioni di controllo sul Culatello di Zibello DOP, l'attività è svolta attraverso servizi unificati di controllo con l'Istituto Nord Est Qualità (INEQ) nell'ambito di un sistema di dipartimentazione delle attività operative, costituendo un sistema di controllo della filiera che è funzionale per le DOP.

L'attività di controllo di IPQ prevede un controllo "a monte della filiera" dei requisiti di origine e di conformità della materia prima e del processo produttivo e un controllo "a valle della filiera" dei requisiti di conformità e di qualità del prodotto. Il sistema di controllo di IPQ si realizza quindi in un sistema di controlli e di verifiche di conformità nelle fasi dell'allevamento, della macellazione e della produzione di salumi, in modo tale da garantire l'osservanza del disciplinare di produzione in tutte le fasi della filiera, dalla produzione della materia prima, sino al termine della stagionatura.

Gli allevatori che producono suini devono fornire garanzie "certe e trasferibili" in relazione all'origine (territorio), alla nascita (data), al tipo genetico, alle metodiche di alimentazione e di allevamento. Entro trenta giorni dalla nascita del suino, su entrambe le cosce, deve essere apposto un tatuaggio recante sia il codice dell'allevamento d'origine (identificato su base provinciale), sia quello del mese di nascita (codice alfabetico d'ogni singolo mese dell'anno). L'apposizione del tatuaggio assicura la macellazione di suini che abbiano compiuto, almeno, nove mesi di vita ed esclude la possibilità di macellare animali nati altrove. Gli allevamenti che curano l'accrescimento dei suini hanno specifici obblighi di carattere alimentare e devono documentare integralmente la propria attività. Ogni singola partita di suini inviata alla macellazione è accompagnata da apposito documento con l'indicazione del numero dei suini, del loro tipo genetico e della loro destinazione.

Il macello deve quindi redigere un documento per ogni singola giornata di macellazione, con l'elencazione di tutte le partite, del numero dei suini ricevuti e macellati, dei relativi codici di provenienza e d'origine. Questo documento accompagnerà ogni singola consegna dei tagli ottenuti dalla macellazione; il suo originale (assieme a copia dei documenti inviati dall'allevamento e richiamati per l'identificazione delle partite di suini macellati) viene raccolto da IPQ-INEQ, controllato ed informatizzato. Questa operazione consente di controllare l'attività degli allevamenti che consegnano suini adulti al macello, di controllare l'attività di macellazione, di incrociare i dati, per verificare l'eventuale diversa origine dei suini rispetto all'allevamento di provenienza e di verificare la disponibilità di materia prima del macello rispetto alle consegne effettuate. Il macello è inoltre tenuto ad apporre sulle cosce un timbro che riproduce il proprio codice di riconoscimento e che ne attesta la conformità globale (di origine, di provenienza e qualitativa). Le cosce timbrate, accompagnate dal documento che "traccia" gli elementi di provenienza dei suini che integrano il tatuaggio di origine, sono quindi raggruppate per iniziare il percorso di trasformazione finale.

Il sistema IPQ-INEQ ha visto crescere il conferimento annuo di suini ai fini della DOP, da 7,7 milioni di suini conferiti nel 2000 ai quasi 9,0 milioni di suini conferiti nel 2005, senza fenomeni di stagionalità marcata per mese dei conferimenti. Per quanto riguarda l'origine dei suini conferiti ai fini delle DOP per regione,

nel 2005, il 54,7% dei suini certificati proveniva da allevamenti lombardi, mentre il 15,8% invece da allevamenti emiliano-romagnoli.

Per quanto riguarda la distribuzione dei suini per tipo genetico, su dati 2005, emerge la prevalenza di suini derivanti da verro ibrido, pari al 56,7% del totale, cui seguono i suini figli meticci di verri di altre razze, con il 27,1% del totale, il 14,7% dei suini certificati è di tipo "Large White" o figlio di verro "Large White", mentre solo l'1,5% dei suini certificati è di tipo "Landrace" o figlio di verro "Landrace".

Per la produzione del Culatello di Zibello DOP i suini devono provenire da allevamenti e macelli ubicati in Lombardia ed Emilia Romagna.

Al fine della certificazione IPQ si avvale del documento riepilogativo emesso dal macello per ogni partita di culatelli freschi/cosce fresche destinati alla produzione a DOP.

Quando le cosce fresche arrivano nei salumifici, il produttore dovrà selezionarle e omologarle, predisponendo il cosiddetto "documento di omologazione" ed annotando gli estremi di tutte le partite su un apposito Registro aziendale fornito dall'organismo di controllo. Il sistema di controllo attuato prevede poi che vengano mensilmente raccolti dal personale ispettivo IPQ i documenti di omologazione per essere verificati e informatizzati. Viene così effettuato un controllo "incrociato" con i documenti emessi dai macelli, che determina la tracciabilità di filiera di ogni singola partita, con la conseguente evidenziazione di eventuali anomalie (non-conformità) negli atti autocertificativi dei vari soggetti. Un sigillo di materiale cartaceo speciale, riportante la data di produzione, verrà quindi apposto sui culatelli omologati. I sigilli vengono forniti dall'organismo di controllo IPQ, che non solo ne effettua la distribuzione ma ne verifica anche la corretta utilizzazione e cura la raccolta di quelli inutilizzati. Tutti i culatelli che presentano la stessa data di produzione apparterranno allo stesso lotto. IPQ, una volta che il produttore ha omologato le partite, considera il produttore esclusivo punto di riferimento del processo autocertificativo poiché i culatelli si trovano ora naturalmente privati della cotenna e quindi sono privi dei segni distintivi di filiera (il tatuaggio dell'allevamento di origine e il timbro di certificazione del macello).

Nell'ultimo periodo di stagionatura, la cui durata minima è di 10 mesi, il personale addetto al controllo ispeziona tutte le partite presentate dal produttore, al fine di verificare la sussistenza dei requisiti di congruità del numero di culatelli stagionati con il numero di quelli disponibili, desunto dalla documentazione e dal Registro aziendale, dell'esistenza delle prescritte caratteristiche organolettiche e merceologiche e dell'assenza di cause di inidoneità di tipo tecnologico, qualitativo ed igienico-sanitario. Durante tale ispezione può anche essere effettuato, il taglio di alcuni culatelli. A termine dell'esame dei diversi lotti/partite presentati ed acquisito il positivo riscontro dei diversi controlli, l'incaricato dell'organismo di controllo autorizza l'apposizione, su ogni culatello ritenuto idoneo, del marchio di conformità, simbolo di identificazione della DOP, e presenza alle relative operazioni. Il marchio di conformità, che riproduce un antico maiale stilizzato, è costituito dallo stesso materiale cartaceo speciale del sigillo ed è gestito direttamente dall'organismo di controllo, che ne custodisce le giacenze e ne affida al personale ispettivo, volta per volta, un numero congruo in rapporto ai quantitativi prodotti da ogni singolo salumificio.

Il Disciplinare del Culatello di Zibello esclude che la DOP possa essere uti-

lizzata per il prodotto preaffettato e preconfezionato: non esistono quindi procedure di controllo su dette operazioni.

Produzione

Dai dati IPQ nel 2005 per l'approvvigionamento delle cosce suine ai fini della DOP del Culatello di Zibello si evidenzia che sono stati presentati all'omologa 50.467 mila culatelli.

Per quanto riguarda il numero di culatelli freschi avviati alla produzione DOP (omologazione all'inizio della lavorazione) i dati resi disponibili dall'IPQ indicano nel 2005 un numero di 48.645 culatelli freschi omologati; se consideriamo l'andamento degli ultimi sei anni notiamo un primo periodo (anni 2000-2003) in cui vi è stato un forte aumento del numero di culatelli freschi avviati alla produzione a DOP in cui i culatelli freschi sono passati da 22.725 a 53.338 (+134,7%), a cui è seguito un secondo periodo (anni 2003-2005) di moderato calo in cui i culatelli freschi omologati sono passati da 53.338 a 48.645 (-8,8%).

Tabella 6: Numero di culatelli freschi avviati alla produzione a DOP (omologazione all'inizio della lavorazione) (Anni 2000-2005)

Anni	Culatelli freschi omologati
2000	22.725
2001	29.317
2002	50.081
2003	53.338
2004	51.204
2005	48.645

Fonte: Istituto Parma Qualità

La produzione del Culatello di Zibello DOP è stata realizzata nel 2005 da 22 imprese per una produzione complessiva di 47.173 culatelli stagionati conformi.

Tale produzione presenta un aumento pari al 355,9% rispetto al 2000 quando la produzione era stata di 10.348 culatelli stagionati.

Tabella 7: Numero di Culatelli di Zibello DOP stagionati conformi (Anni 2000-2005)

Anni	Culatelli di Zibello DOP stagionati conformi
2000	10.348
2001	23.332
2002	31.743
2003	49.209
2004	52.190
2005	47.173

Fonte: Istituto Parma Qualità

Per quanto riguarda i controlli finali di conformità per l'apposizione del contrassegno DOP Culatello di Zibello, i culatelli stagionati controllati sono stati nel 2005 47.458, l'IPQ ha rilevato 285 non conformità e i culatelli stagionati conformi sono risultati quindi 47.173. Un'ulteriore quota è stata distolta dalla produzione per effetto stesso dell'attività di autocontrollo dei produttori, 656 nel 2005.

Tabella 8: Approvvigionamento della materia prima ai fini della DOP Culatello di Zibello (Anno 2005)

Periodo	Totale presentato	Totale non conforme	Totale non omologato	Totale omologato DOP
Gennaio	6.068	-	159	5.909
Febbraio	6.140	-	192	5.948
Marzo	2.774	11	71	2.692
Aprile	2.405	3	115	2.287
Maggio	2.479	-	142	2.337
Giugno	2.871	-	59	2.812
Luglio	1.900	-	88	1.812
Agosto	2.057	-	92	1.965
Settembre	2.794	-	131	2.663
Ottobre	6.869	-	137	6.732
Novembre	8.088	-	365	7.723
Dicembre	6.022	-	257	5.765
Totali	50.467	14	1.808	48.645

Fonte: Istituto Parma Qualità

Tabella 9: Controllo finale per l'apposizione del contrassegno DOP Culatello di Zibello sui culatelli stagionati (Anno 2005)

Mese	Culatelli stagionati controllati	Culatelli stagionati non conformi	Culatelli stagionati distolti	Culatelli stagionati conformi
Gennaio	7.299	59	67	7.240
Febbraio	1.930	19	2	1.911
Marzo	1.471	19	1	1.452
Aprile	2.551	22	-	2.529
Maggio	2.671	21	70	2.650
Giugno	1.543	9	2	1.534
Luglio	4.680	12	94	4.668
Agosto	2.467	28	10	2.439
Settembre	6.878	19	243	6.859
Ottobre	5.361	26	155	5.335
Novembre	6.167	33	6	6.134
Dicembre	4.440	18	6	4.422
In totale	47.458	285	656	47.173

Fonte: Istituto Parma Qualità

Tabella 10: Numero di imprese riconosciute per la produzione del Culatello di Zibello DOP e numero culatelli avviati alla produzione

Anno	Totale imprese	Totali culatelli	Imprese consorziate	Culatelli Imprese consorziate	Imprese non consorziate	Culatelli Imprese non consorziate
2000	15	22.725	13	10.066	2	12.659
2001	15	29.317	13	11.656	2	17.661
2002	18	50.081	14	16.285	4	33.796
2003	18	53.338	14	17.690	4	35.648
2004	21	51.204	14	17.569	7	33.635
2005	22	48.645	15	20.271	7	28.374

Fonte: Istituto Parma Qualità

Delle 22 imprese considerate nel 2005 15 aderiscono al già ricordato Consorzio del Culatello di Zibello e rappresentano il 68% dei produttori e il 42% dei culatelli avviati alla produzione, pertanto le restanti 7 imprese rappresentano il 32% dei produttori e il 58% dei culatelli avviati alla produzione.

Sulla base del numero di culatelli avviati alla produzione dall'anno 2000 al 2005 i dati ripartiti tra imprese aderenti al Consorzio del Culatello di Zibello e non aderenti evidenziano come per entrambi i raggruppamenti si è avuto più di un raddoppio dell'attività di produzione, 101% per le aziende aderenti al Consorzio e 124% per quelle non aderenti. Da notare inoltre come le imprese aderenti al Consorzio rappresentavano il 44% dei culatelli avviati alla produzione nel 2000 e il 42% nel 2005.

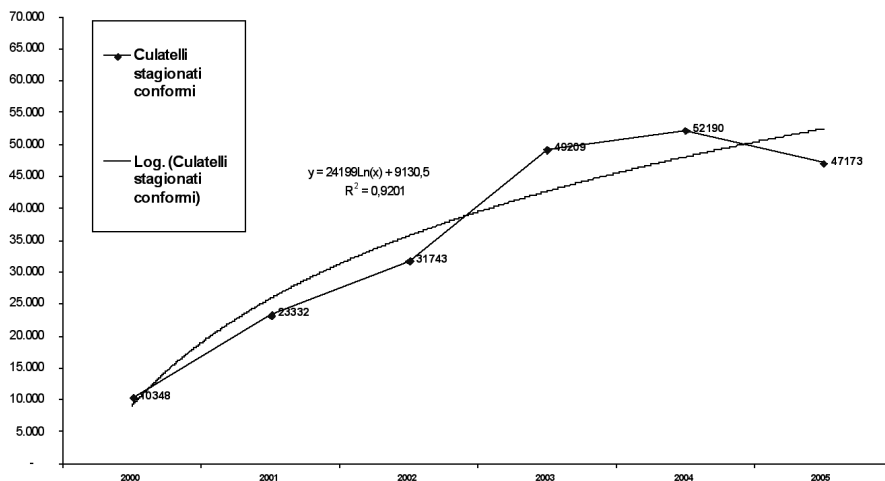
Nel 2005 le imprese di dimensione fino a 1.000 culatelli/anno lavorati rappresentano il 50% del numero delle imprese ma solo il 13% della produzione. Una unica impresa, che produce oltre 5.000 culatelli/anno, rappresenta il 27,5% della produzione, si rileva inoltre come il 55% della produzione è rappresentato da solo quattro imprese che producono oltre 4.000 culatelli all'anno.

Nel 2000, con un numero complessivo di 15 imprese, il 60% delle imprese, quelle fino a 1.000 culatelli/anno lavoravano il 16% dei culatelli e unitamente a quelle fino a 2.000 culatelli/anno rappresentavano l'87% delle imprese e il 38% dei culatelli, mentre una sola impresa, che produce oltre 5.000 culatelli/anno, avviava alla produzione il 48% dei culatelli totali.

Se analizziamo in modo separato le imprese aderenti al Consorzio del Culatello di Zibello da quelle non aderenti appaiono sostanziali differenze strutturali.

Grafico 1:

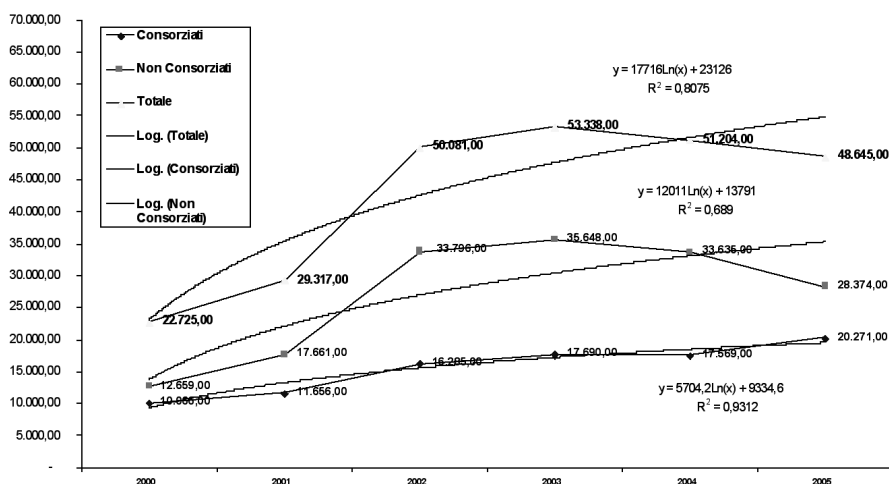
Numero Culatelli di Zibello DOP stagionati conformi (Anni 2000-2005)



Fonte: Nostra elaborazione su dati IPQ

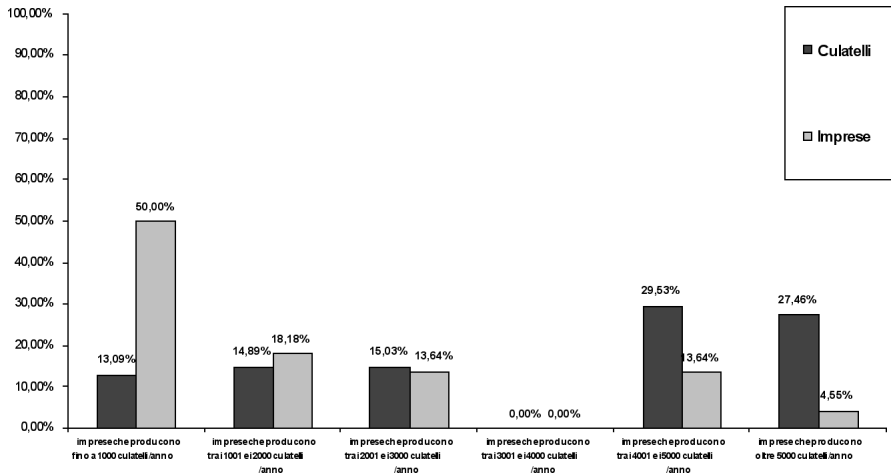
Grafico 2:

Numero Culatelli avviati alla produzione (Anni 2000-2005)



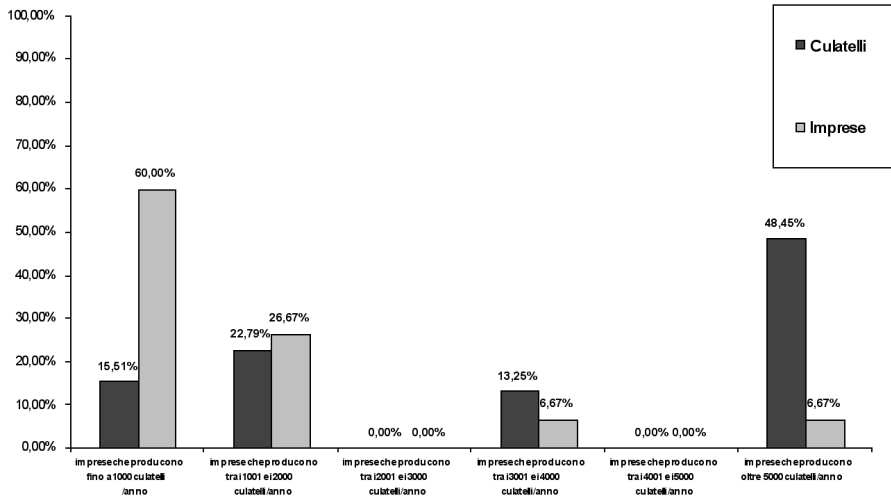
Fonte: Nostra elaborazione su dati IPQ

Grafico 3:
Totale imprese e culatelli avviati alla produzione per dimensione aziendale dato percentuale (Anno 2005)



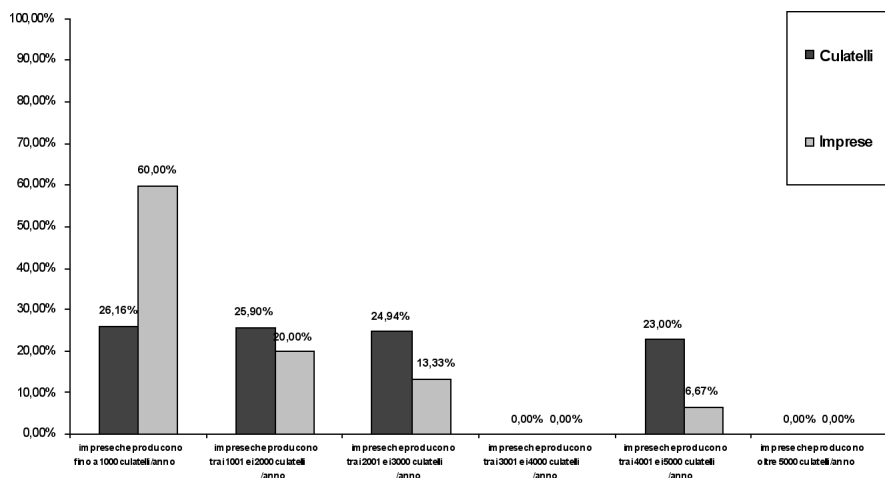
Fonte: Nostra elaborazione su dati IPQ

Grafico 4:
Totale imprese e culatelli avviati alla produzione per dimensione aziendale dato percentuale (Anno 2000)



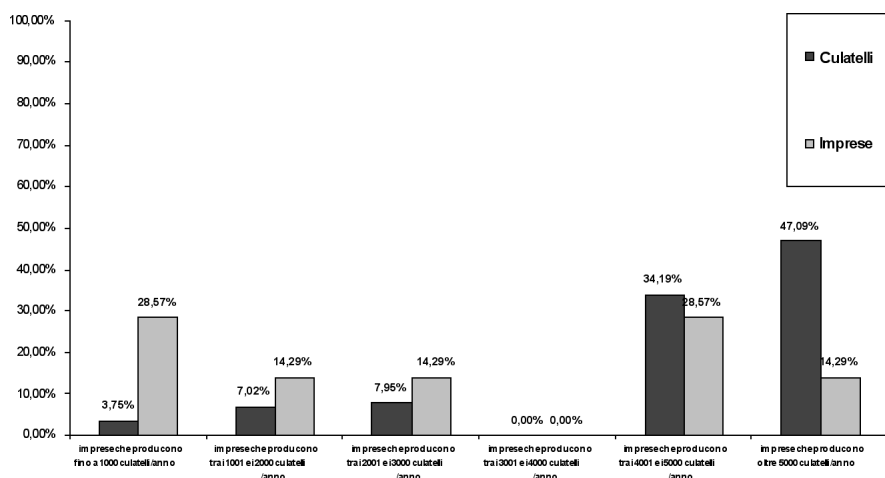
Fonte: Nostra elaborazione su dati IPQ

Grafico 5: Numero imprese e numero culatelli avviati alla produzione dato percentuale delle imprese consorziate (Anno 2005)



Fonte: Nostra elaborazione su dati IPQ

Grafico 6: Numero imprese e numero culatelli avviati alla produzione dato percentuale delle imprese non consorziate (Anno 2005)



Fonte: Nostra elaborazione su dati IPQ

Nel 2005 per quanto riguarda le imprese consorziate emerge come quelle che lavorano fino a 2.000 culatelli/anno rappresentano l'80% delle imprese e il 52% dei culatelli avviati alla produzione mentre una sola impresa lavora tra 4.000 e 5.000 culatelli e rappresenta il 23% dei culatelli avviati alla produzione dalle imprese aderenti al Consorzio.

La percentuale di imprese consorziate che nel 2000 producevano fino a 2.000 culatelli all'anno era del 92% (pari a 12 imprese) con un produzione che superava il 70% dell'intera produzione mentre una sola impresa lavorava il restante 30% della produzione.

Di contro le imprese non consorziate nel 2005 concentrano in 3 imprese che lavorano oltre 4.000 culatelli/anno, 43% delle imprese, l'81% dei culatelli avviati alla produzione. Nel 2000 le sole due imprese non consorziate rappresentavano l'una il 13% e l'altra l'87% dei culatelli avviati alla produzione

Dai dati emerge come il comparto presenta un limitato numero di imprese e di Culatelli di Zibello DOP prodotti, stante una forte caratterizzazione di lavorazione artigianale e con la presenza solo di poche imprese, complessivamente 4, 1 aderente al Consorzio del Culatello di Zibello e 3 non consorziate, che presentano una produzione di oltre 4.000 culatelli/anno, tra queste ultime una sola impresa supera i 10.000 culatelli/anno a dimostrazione della presenza anche di imprese di più ampie dimensioni che necessitano di sistemi di organizzazione della produzione e di approccio al mercato più complessi.

Conclusioni

In provincia di Parma il comparto della lavorazione delle carni assume un peso notevole nel complesso del sistema economico, il Prosciutto di Parma DOP, con 9,8 milioni di pezzi marchiati, rappresenta una delle produzioni caratterizzanti il territorio, ma assieme ad esso spicca pure per gli aspetti qualitativi il Culatello di Zibello DOP. Nel 1996 il Culatello ha ottenuto il marchio DOP sulla base della normativa europea contenuta nel Reg. CEE 2081/92 ed il riconoscimento del Reg. (CE) N. 1107/96. Nel 2005 sono risultati conformi ed hanno ottenuto il marchio DOP 47.173 culatelli. Il Culatello di Zibello è prodotto in provincia di Parma da 22 imprese, nel territorio limitrofo al fiume Po. All'interno della DOP Culatello di Zibello un gruppo di 15 produttori si è dato un disciplinare più restrittivo di quello adottato dalla DOP stessa e ha costituito il Consorzio del Culatello di Zibello. Il Culatello di Zibello è ottenuto dal fascio dei muscoli crurali posteriori ed interni della coscia del suino, a stagionatura ultimata, non prima dei 10 mesi, deve presentare un peso compreso tra i 3 ed i 5 kg e avere forma a "pera" con leggero strato di grasso nella parte convessa. L'attività di controllo per l'apposizione del marchio DOP viene svolta dall'Istituto Parma Qualità il quale si fa carico del complesso delle attività di controllo lungo la filiera del Culatello di Zibello, dall'allevamento sino al termine della stagionatura. L'attività si sostanzia in un insieme di controlli e di verifiche di conformità dell'allevamento, della macellazione e della produzione di culatelli, al fine di garantire la tracciabilità e l'osservanza del disciplinare di produzione in tutte le fasi della filiera.

Sulla base del numero di culatelli avviati alla produzione dall'anno 2000 al

2005 ripartiti tra imprese aderenti al Consorzio del Culatello di Zibello e quelle non aderenti emerge che per entrambi i raggruppamenti si é avuto un raddoppio dell'attività, 101% per le aziende aderenti al Consorzio e 124% per quelle non aderenti. Il comparto ha avuto un forte sviluppo ed è alla ricerca di un assetto maggiormente stabile, si caratterizza per la massiccia presenza di imprese artigianali, prevalentemente di piccole dimensioni, che producono alcune centinaia di culatelli unicamente nel periodo autunnale e invernale, e per la presenza di un numero limitato di imprese di più ampie dimensioni con produzione di oltre 4.000 culatelli/anno e con produzione in tutti i periodi dell'anno.

In provincia di Parma la coscia posteriore del suino viene così ad essere valorizzata con la lavorazione del Prosciutto di Parma DOP, nella fascia a sud della via Emilia, pedecolle e collina fino a 900 metri di altitudine s.l.m., e con la lavorazione del Culatello di Zibello DOP, nella fascia a nord in un territorio di bassa pianura limitrofa al fiume Po, in un ambiente con clima più umido. Il Culatello di Zibello per le proprie caratteristiche qualitative, per l'apprezzamento che viene ad avere sul mercato, risulta un prodotto di particolare pregio che ha avuto un ampio aumento di produzione salvaguardando tuttavia un elevato livello qualitativo. Attualmente è alla ricerca di un assetto più stabile del sistema produttivo e potrà aspirare, mantenendo l'elevato livello di qualità, ad ulteriori possibilità di sviluppo.

Bibliografia

1. ASS.I.C.A. (2006) Rapporto Annuale 2005, Milano.
2. Bonazzi G., (2002) *“Aspetti della gestione delle imprese agroindustriali: prosciuttificio in provincia di Parma”*, Supplemento all'avvenire Agricolo, n. 6.
3. IPQ, INEQ (2002), *“Certificare l'origine della qualità”*, IPQ, INEQ, Parma.
4. ISMEA, FEDERALIMENTARE (2003), *“Il sistema agroalimentare italiano: profili di uno scenario globale”*, ISMEA-FEDERALIMENTARE, Roma.
5. Mariani A., Vigano E., (2002) *“Il sistema agroalimentare dell'Unione Europea”*, Carocci, Roma.
6. U.P.I. (2006) *“Parma e le sue imprese”*, Parma.

LA VALUTAZIONE DEI PROGETTI DI INVESTIMENTO: UN'APPLICAZIONE AL COMPARTO DELLA LAVORAZIONE DELLE CARNI¹

Giuseppe Bonazzi, Mattia Iotti²

PAROLE CHIAVE:

investimento nel settore delle carni, valutazione dei progetti di investimento, valutazioni basate sui flussi, sostenibilità degli investimenti.

KEY WORDS:

investment in meat sector, investment evaluation, cash flow based evaluations, capacity to sustain investment.

Sommario

La valutazione dei progetti di investimento e la valutazione della loro sostenibilità nel tempo assumono importanza nelle decisioni di gestione d'impresa. Si può così fare il confronto tra risultati di gestione di imprese diverse e scegliere tra investimenti alternativi. Nella parte metodologica del lavoro sono analizzati i metodi tradizionali di valutazione fondati su valori di derivazione contabile (*Roi, Roe, Rod*), integrati con metodologie di valutazione fondate sui flussi di cassa (*Pbpa, Van, Tir, Ev₀Dcf*), e con metodologie volte alla determinazione della sostenibilità del ciclo aziendale (*Dscr, Adscr, Llcr*). Si sono pure analizzati i valori di un'impresa o di un progetto di investimento (W_0) attualizzando i proventi che l'impresa genererà a favore dell'investitore, dividendi, flussi di cassa, redditi, secondo modelli reddituali o finanziari.

Nella parte applicativa sono stati calcolati gli indici di derivazione contabile (*Roi, Roe, Rod*), gli indici di valutazione degli investimenti basati sui flussi (*Pbpa, Van, Tir, Ev₀Dcf*), e gli indici di sostenibilità del ciclo aziendale (*Dscr, Adscr, Llcr*). Dal caso aziendale analizzato emerge come un'impresa che ha effettuato investimenti in tecnologie in sede di avvio dell'attività ha esiti gestionali positivi, pur in una situazione del comparto caratterizzata da crisi di mercato. L'impresa analizzata genera infatti flussi di cassa superiori al servizio dell'indebitamento, anche per effetto di risparmi di costo derivanti dall'innovazione di processo. Nel caso aziendale gli investimenti effettuati producono flussi di reddito positivi e sono sostenibili. Ai fini di una corretta analisi dei risultati della gestione aziendale è opportuno utilizzare diverse metodologie di valutazione dei progetti di investimento in quanto i relativi ri-

¹ Lo studio è frutto del lavoro comune dei due autori, tuttavia, in sede di stesura del testo Giuseppe Bonazzi ha redatto i paragrafi 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 12 Mattia Iotti ha redatto i paragrafi 6, 7, 10, 11.

² Sezione Risorse del Territorio, Dipartimento di Salute Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Parma.

sultati devono essere considerati alla luce dei limiti e dei postulati di base dei diversi approcci di metodo.

Abstract

The valuation of investment and the valuation of capacity to sustain investment have importance in taking management decision. That methods allow to compare management result in different companies, moreover that methods allow to select between alternative investment. In the methodological part, the paper analyses traditional methods of investment valuation, based upon administrative data (*Roi*, *Roe*, *Rod*). The paper analyses cash flow based evaluations (*Pbpa*, *Van*, *Tir*, Ev_0Dcf) and methods focused on capacity to sustain investment (*Dscr*, *Adscr*, *Llcr*). Even, it was analysed the actual firm value, or the actual investment value, (W_0) by calculating the present value of the proceeds in favour of investor, as dividend, cash flow or income, using data deriving by income model or financial model.

In the applied part of the paper, are calculated the index based upon administrative data (*Roi*, *Roe*, *Rod*), the index based on cash flow are calculated to evaluate investment (*Pbpa*, *Van*, *Tir*, Ev_0Dcf) the index focused on capacity to sustain investment (*Dscr*, *Adscr*, *Llcr*).

From the analysed case it is possible to have evidence that a company realizing investment in technology at the start up could achieve positive results, even in a market crisis scenario. The analysed company, in fact, is able to generate a cash flow higher than debt service, because of a general cost reduction. It is caused by investment in process innovation. The company analysed in the case study generates positive flow of income and it is characterized by sustainable investment. Moreover, to analyse in a correct matter the management result, it is advisable to use different methods, in order to value investment. The paper shows that the methods could generate different results, because of different methodological basis hypothesis.

1. Premessa

La valutazione dei progetti di investimento e la valutazione della loro sostenibilità nel tempo assumono importanza nelle decisioni di gestione d'impresa. La scelta di investimenti caratterizzati da redditività e sostenibilità diventa importante per permettere alle imprese di generare reddito e perdurare nel tempo, in particolare in momenti di crisi e di profondi cambiamenti all'interno di un settore.

In tale contesto, il lavoro propone alcune metodologie di analisi e valutazione dei progetti di investimento, con applicazione ad un caso d'impresa del comparto della lavorazione delle carni.

2. Le analisi economico contabili e le analisi finanziarie

Le analisi gestionali al fine della valutazione di redditività e sostenibilità dei progetti permettono il confronto tra investimenti effettuati da imprese dello stesso settore e di settori economici diversi tra loro, selezionando quindi tra progetti di

investimenti alternativi. Tali valutazioni interessano la proprietà, la direzione delle imprese e soggetti esterni che hanno relazioni con le imprese stesse, come gli istituti di credito, in tema di concessione di finanziamenti.

Le valutazioni di redditività e sostenibilità degli investimenti si fondano su metodologie che hanno come base di partenza il bilancio d'esercizio ed il rendiconto finanziario. Queste metodologie sono suddivise in metodologie di derivazione contabile e metodologie di derivazione finanziaria.

Per tali analisi il punto di partenza, in termini di base dati, è il bilancio d'esercizio. In caso di approfondimenti nelle valutazioni questi dati possono essere integrati con dati contabili dell'impresa, con dati del sistema informativo interno, con piani di ammortamento di mutui, con perizie e valutazioni al fine di disporre di informazioni aggiuntive.

La valutazione esterna è possibile in quanto il bilancio d'esercizio, documento dell'informativa esterna d'impresa, è pubblico.

Le analisi che hanno come riferimento il bilancio d'esercizio si focalizzano sugli aspetti di analisi di redditività, liquidità e solidità. Dette analisi sono condotte mediante indici di bilancio volti alla definizione sintetica di aspetti gestionali complessi.

Al fine di procedere alla valutazione di sostenibilità del ciclo aziendale il bilancio d'esercizio è integrato con informazioni relative alla dinamica finanziaria, punto di partenza per lo sviluppo di metodologie di valutazione che hanno come riferimento i flussi di cassa.

La valutazione delle imprese e dei progetti si realizza anche attraverso tecniche finanziarie di valutazione. Queste metodologie permettono di cogliere aspetti della dinamica d'impresa, quali il valore dell'impresa nel suo complesso o il valore degli investimenti in progetti specifici, che sono colti parzialmente dagli indici di bilancio derivati dall'analisi del bilancio d'esercizio.

Le metodologie finanziarie considerano il manifestarsi dei flussi di cassa nel tempo.

In tale ambito si fa riferimento (Pavarani E., pag. 389, op. cit.) alle formule di matematica finanziaria relative alla attualizzazione (sconto) di un flusso futuro, al fine di esprimere il suo valore attuale:

$$F_0 = F_t(1+k)^{-t} \quad (1)$$

Dove:

F_0	=	valore del flusso al tempo 0 (attuale);
$(1+k)$	=	fattore di sconto;
t	=	tempo di manifestazione del flusso.

La valutazione mediante criteri finanziari permette di valutare la capacità di restituzione del debito contratto per la realizzazione degli investimenti.

Le metodologie di derivazione contabile e le metodologie finanziarie sono complementari anche se forniscono risultati a volte divergenti.

Il bilancio d'esercizio è redatto secondo il principio della competenza economica, mentre l'analisi della dinamica dei flussi finanziari è effettuata secondo il prin-

cipio di cassa. Le analisi di tipo finanziario utilizzano anch'esse comunque il bilancio d'esercizio come base dati indispensabile per la ricostruzione di flussi di cassa.

Il principio di competenza ha come oggetto d'analisi il patrimonio netto, e la modificazione che questo subisce per effetto della gestione, attraverso il reddito d'esercizio, con riguardo alla correlazione tra componenti positive e negative di reddito. Il principio di cassa ha come oggetto d'analisi la variazione delle disponibilità liquide, e le modificazioni che queste subiscono per effetto dei flussi in entrata ed in uscita derivanti da operazioni di gestione, che costituiscono la dinamica finanziaria dell'impresa.

3. Metodi tradizionali di valutazione degli investimenti

Le metodologie di derivazione contabile sono definite anche metodi tradizionali di valutazione degli investimenti e utilizzano l'analisi per indici.

Un primo indice utilizzato (Pavarani E., pag. 145, op. cit.) è il rendimento operativo medio contabile, dato dal *Roi* (Return on investment) del progetto stesso:

$$Roi = \frac{Ro}{Ci} \quad (2)$$

Dove:

Roi = return on investment (*Roi*);
Ro = reddito operativo;
Ci = capitale investito.

Il reddito operativo è definito come somma algebrica delle componenti positive e negative di reddito di tipo operativo, cioè espressive della gestione caratteristica corrente. Non sono quindi incluse poste di tipo finanziario e straordinario.

Viene considerato anche (Pavarani E., pag. 144, op. cit.) il rendimento medio contabile netto, dato dal *Roe* (Return on equity):

$$Roe = \frac{Rn}{Cn} \quad (3)$$

Dove:

Roe = return on equity (*Roe*);
Rn = reddito netto;
Cn = capitale netto.

Per mettere a confronto la redditività del capitale con il costo dell'indebitamento si utilizza (Pavarani E., pag. 176, op. cit.) il *Rod* (Return on debts), espressivo del costo medio dell'indebitamento:

$$Rod = \frac{Sf}{Pfn} \quad (4)$$

Dove:

Rod = return on debts (*Rod*);

Sf	=	saldo della gestione finanziaria in valore assoluto;
Pfn	=	posizione finanziaria netta in valore assoluto.

Sia il *Roi* sia il *Roe*, sebbene molto diffusi a livello internazionale ed estremamente utilizzati nelle analisi di bilancio, non sono adatti, secondo parte della letteratura, nella valutazione delle imprese e dei progetti di investimento, a motivo di assenza di attualizzazione, distorsione derivante dall'applicazione di criteri contabili, considerazione del principio di competenza economica e non dei flussi di cassa al fine della valutazione, assenza di considerazione della rischiosità del progetto (in particolare in presenza di necessità di confronto tra alternative di investimento).

4. Valutazioni degli investimenti basate sui flussi

Ulteriori metodologie di valutazione delle imprese e dei progetti di investimento sono quelle fondate sui flussi.

I metodi basati sui flussi si fondano sulla loro possibilità di utilizzo per le diverse finalità relative alla valutazione delle imprese (Guatri L., Bini M., pag. 23, op. cit.).

Con l'espressione modelli fondati sui flussi si indicano due modelli principali di valutazione, cioè il modello reddituale ed il modello finanziario.

La formulazione per esprimere il valore odierno di un'impresa o di un progetto di investimento, indicato con W_0 , può essere rappresentata attraverso due metodologie o ottiche.

La prima metodologia privilegia l'ottica dell'investitore o ottica esterna:

$$W_0 = \sum_{t=1}^n d_t v^t + P_n v^n \quad (5)$$

Dove:

W_0	=	valore odierno di un'impresa;
d_t	=	dividendo pagato dall'impresa nell'anno t (per t da 1 ad n);
P_n	=	prezzo più probabile di cessione dell'impresa al tempo futuro n;
v^t, v^n	=	coefficienti di attualizzazione (sulla base di opportuni tassi).

Questa formula esprime la rappresentazione attualizzata di tutti i proventi che l'impresa genererà a favore dell'investitore dal momento di acquisto t_0 al momento della cessione t_n . La formula può essere espressa anche (Guatri L., Bini M., pag. 478, op. cit.) considerando la formula definita *Ddm* (Dividend discount model) che definisce il valore come somma di tutti i dividendi percepiti dall'azionista senza limiti di tempo, senza considerare quindi un orizzonte di tempo limitato e senza capital gain finale derivante dalla cessione dell'investimento al relativo valore di mercato:

$$W_0 = \frac{d_1}{i} \quad (6) \quad oppure \quad W_0 = d_1 \frac{1+g}{i-g} \quad (7)$$

Dove:

W_0	=	valore odierno di un'impresa;
d_1	=	dividendo pagato dall'impresa nell'anno 1;
i	=	tasso di attualizzazione;
g	=	tasso di crescita.

La seconda metodologia (Guatri L., Bini M., pag. 23, op. cit.) privilegia l'ottica dell'impresa o ottica interna:

$$W_0 = \sum_{t=1}^n F_t v^t \quad (8)$$

Dove:

F_t	=	flusso per l'anno t (per t da 1 ad n, e con n tendente ad infinito);
v^t	=	coefficiente di attualizzazione (sulla base di opportuni tassi).

Il flusso atteso può essere definito in senso economico come reddito o in senso finanziario come flusso di cassa.

Il modello finanziario utilizza i flussi di cassa attesi, in luogo dei dividendi e considerando, in luogo di un prezzo di cessione, un valore terminale V_t (Terminal value) attualizzato (Guatri L., Bini M., pag. 478, op. cit.). Ne consegue che i flussi attesi sono suddivisi in due periodi, di cui il primo è detto di "previsione analitica" mentre il secondo è detto di "previsione sintetica" ed espresso dal valore terminale V_t :

$$W_0 = \sum_{t=1}^n F_t v^t + V_t \cdot v^n \quad (9)$$

Dove:

V_t	=	valore terminale (Terminal value).
-------	---	------------------------------------

Il modello reddituale utilizza, in luogo dei dividendi, i redditi generati dall'impresa. Una prima modalità (Guatri L., Bini M., pag. 478, op. cit.) prevede un reddito medio annuo per un periodo illimitato, comprendendo in questo anche il valore terminale:

$$W_0 = \frac{R}{i} \quad (10) \quad oppure \quad W_0 = R \frac{1+g}{i-g} \quad (11)$$

Dove:

R	=	reddito medio annuo.
-----	---	----------------------

Una seconda modalità (Guatri L., Bini M., pag. 478, op. cit.) prevede i redditi prodotti anno per anno per un numero n di anni futuri. In questo caso la previsione analitica è definita negli n anni, e si assume un valore terminale da attualizzare:

$$W_0 = \sum_{t=1}^n R_t v^t + V_t \cdot v^n \quad (12)$$

Dove:

$$R_t = \text{reddito annuo.}$$

Il modello reddituale utilizza il bilancio d'esercizio come base dati, mentre per la determinazione dei flussi di cassa da utilizzare nel modello di valutazione fondato sui flussi si utilizza il rendiconto finanziario. Il rendiconto finanziario è il principale strumento di analisi della dinamica finanziaria ed assume generalmente forma scalare. Nel caso in cui il rendiconto finanziario intenda essere esplicativo della variazione delle disponibilità liquide nei diversi anni si parla di "rendiconto finanziario dei flussi di cassa". Nel caso in cui la variabile oggetto di analisi sia il capitale circolante, si adotta il rendiconto finanziario definito "dei flussi di capitale circolante". Il rendiconto finanziario evidenzia come primo risultato intermedio il saldo finanziario relativo alla gestione caratteristica corrente e successivamente analizza i flussi finanziari in entrata ed in uscita che riguardano operazioni non discrezionali. Viene così evidenziato l'unlevered free cash flow ($Ufcf$), definito come differenza tra il flusso di cassa della gestione caratteristica corrente (autofinanziamento reale) e gli impegni netti non discrezionali. Quando $Ufcf$ assume valore positivo, sono disponibili risorse monetarie da utilizzare per operazioni discrezionali, ad esempio nuovi investimenti o pagamento di dividendi. Quando $Ufcf$ assume valore negativo l'impresa deve ricorrere a nuove fonti di finanziamento in termini di capitale proprio e capitale di terzi per far fronte agli impegni non discrezionali di tipo finanziario.

Da notare come $Ufcf$ è un flusso di cassa residuale, generato dall'attività operativa sottratti gli investimenti di capitale, disponibile quindi per attività discrezionali. La formula (Shrieves R., Wachowicz M., pag. 4, op. cit.) relativa al calcolo dell'unlevered free cash flow è la seguente:

$$Ufcf = Ebit(1 - t_m) + DA - \Delta I_{cf} - \Delta I_{cc} \pm T_{da} \quad (13)$$

Dove:

$Ufcf$	=	unlevered free cash flow;
$Ebit$	=	reddito operativo (earning before interest and tax);
t_m	=	aliquota marginale d'imposta dell'impresa analizzata;
DA	=	svalutazioni e ammortamenti (depreciation e amortisation);
I_{cf}	=	investimenti in capitale fisso;
I_{cc}	=	investimenti in capitale circolante;
T_{da}	=	imposte differite e anticipate (Tax).

Relativamente alla valutazione degli investimenti, il primo metodo utilizzato è quello relativo al tempo di recupero dell'investimento attualizzato (Pay back period attualizzato). La metodologia (Pavarani E., pag. 392, op. cit.) esprime, in termini temporali, l'intervallo necessario affinché i flussi di cassa cumulati previsti siano pari all'uscita finanziaria (iniziale) per l'effettuazione dell'investimento:

$$\sum_{t=1}^{Pbpa} F_t (1 + k)^{-t} - F_0 \quad (14)$$

Dove:

$Pbpa$	=	pay back period attualizzato;
F_t	=	flusso di cassa al tempo t;
F_0	=	flusso monetario iniziale;
k	=	tasso di attualizzazione.

La suddetta formulazione esprime il numero di periodi necessari affinché i portatori di capitale siano ripagati dell'investimento iniziale sostenuto.

Nell'ambito delle valutazioni fondate sui flussi, la metodologia del Valore attuale netto (Van) è la metodologia che meglio unisce gli obiettivi di creazione di valore con le decisioni di investimento. Il Van esprime la quantità monetaria generata o distrutta per effetto del progetto di investimento, considerando i flussi di cassa, il momento temporale di manifestazione dei flussi medesimi e l'attualizzazione dei flussi sulla base di un tasso coerente con il profilo di rischio dell'investimento. È da considerare come la formulazione del Van (Pavarani E., pag. 399, op. cit.) presenta l'ipotesi implicita di reinvestimento dei flussi derivanti dal progetto di investimento al tasso di rendimento del capitale (k):

$$Van = \sum_{t=1}^n \frac{F_t}{(1+k)^t} - F_0 \quad (15)$$

Dove:

Van	=	valore attuale netto;
F_t	=	flusso di cassa al tempo t;
F_0	=	flusso di cassa negativo iniziale;
k	=	tasso di sconto.

Poiché alcuni progetti hanno una fase di avvio superiore al periodo temporale di riferimento, generalmente annuale, è possibile (Pavarani E., pag. 399, op. cit.) procedere al calcolo separato delle entrate e delle uscite:

$$Van = \sum_{t=0}^n \frac{FE_t}{(1+k)^t} - \sum_{t=0}^n \frac{FU_t}{(1+r)^t} \quad (16)$$

Dove, rispetto alla precedente:

FE_t	=	flusso di cassa in entrata al tempo t;
FU_t	=	flusso di cassa in uscita al tempo t;
r	=	rendimento del capitale.

La formula utilizza due differenti tassi di sconto, tali per cui i flussi di cassa positivi sono scontati al tasso k (costo del capitale) mentre i flussi di cassa negativi sono scontati al tasso r (rendimento del capitale). La formula prevede quindi che i flussi di cassa in entrata (FE) ed i flussi di cassa in uscita (FU) siano considerati ed attualizzati separatamente.

Un'altra metodologia di valutazione (Pavarani E., pag. 403, op. cit.) è il metodo del Tasso di rendimento interno (Tir). Il Tir esprime il tasso che rende il valore attuale netto dell'investimento uguale a zero, cioè il tasso che rende uguali i flussi di cassa attualizzati in entrata ed in uscita:

$$\sum_{t=1}^n F_t(1 + Tir)^{-t} = F_0 \quad (17)$$

Dove:

Tir	=	tasso di rendimento interno;
F_t	=	flusso di cassa al tempo t ;
F_0	=	flusso di cassa negativo iniziale.

Il Tir definisce un tasso lordo di rendimento dell'investimento che tuttavia non considera la dimensione quantitativa dell'investimento ed il costo del capitale.

5. L'approccio del valore

Accanto alle metodologie fondate sui flussi, si aggiungono alcune metodologie di valutazione di recente formulazione, che hanno conosciuto un'importante diffusione. Tra queste va citato l'Economic value added (*Eva*®), indicatore suggerito da Stern e Stewart. La metodologia è un'evoluzione di studi avviati a partire dagli anni intorno al 1920 da Alfred Sloan. Nella formulazione proposta da Stern e Stewart l'Eva è pari al risultato operativo al netto del costo di tutte le forme di finanziamento, incluso il costo dei mezzi propri apportati dai soci/azionisti (Pavarani E., pag. 363, op. cit.), voce non considerata dai metodi contabili tradizionali:

$$Eva = Nopat - CI \cdot Wacc \quad (18)$$

Dove:

Eva	=	economic value added;
$Nopat$	=	risultato operativo al netto delle imposte (Net operating profit after taxes);
CI	=	capitale investito (capitale proprio, debiti, accantonamenti);
$Wacc$	=	costo medio ponderato del capitale (weighted average cost of capital).

Il capitale investito è dato dalla somma di tutte le fonti di finanziamento, mentre alcuni autori consigliano l'esclusione delle poste del passivo di tipo operativo quali, ad esempio, i debiti di fornitura. Il $Wacc$ è definito (Pavarani E., pag. 364, op. cit.) come valore percentuale di ogni forma di finanziamento (debiti e mezzi propri) ponderata con il relativo peso, e valutata a prezzi di mercato:

$$Wacc = Kd(1 - T_m) \frac{D}{V} + Ke \frac{E}{V} \quad (19)$$

Dove:

$Wacc$	=	tasso di costo medio ponderato del capitale (weighted average cost of capital);
Kd	=	tasso di costo del debito al lordo delle imposte;
Ke	=	costo dei mezzi propri;
T_m	=	aliquota marginale d'imposta dell'impresa analizzata;

D	=	valore di mercato del debito;
E	=	valore di mercato dei mezzi propri;
V	=	valore complessivo dell'impresa ($D + E$).

È da considerare come nel calcolo del *Wacc* esistono problemi di metodo relativi alla stima del costo del debito e alla stima del costo dei mezzi propri. Al riguardo, per quanto concerne la stima del costo del debito al lordo delle imposte (Kd) si parla di tasso di interesse marginale di lungo periodo, e non del tasso correntemente pagato dall'impresa analizzata sul debito in essere. Una modalità alternativa (Pavarani E., pag. 365, op. cit.) è quella di stimare il costo del debito (Kd) sulla base della seguente formula:

$$Kd = R_f + Spread_i \quad (20)$$

Dove:

Kd	=	tasso di costo del debito al lordo delle imposte;
R_f	=	rendimento atteso di investimento privo di rischio;
$Spread_i$	=	spread su tasso privo di rischio pagato da un'impresa con rating i .

Generalmente R_f è dato dal tasso risk free coerente con quello utilizzato per il calcolo del Kd , ad esempio il tasso di buoni del tesoro di stato di primario rating, con scadenza a 5 o 10 anni.

Relativamente alla misura del costo dei mezzi propri (Ke), definito come il rendimento minimo atteso dagli investitori a remunerazione dell'investimento in impresa, sono utilizzati alcuni modelli. Tra questi uno dei più rilevanti (Pavarani E., pag. 367, op. cit.) è il Capital asset pricing model (*Capm*):

$$Ke = R_f + \beta_i \cdot Mrp \quad (21)$$

Dove:

Ke	=	tasso di costo dei mezzi propri;
R_f	=	rendimento atteso di un investimento privo di rischio;
β_i	=	parametro espressivo del rischio dell'impresa β -levered;
Mrp	=	rendimento di mercato atteso in eccesso rispetto al tasso R_f (Market risk premium).

Nelle indicazioni della letteratura $Spread_i$ e Mrp sono giudicati coincidenti. Da notare come il β -levered, cioè il rischio di un'impresa è calcolato (Pavarani E., pag. 372, op. cit.) sulla base della seguente formula:

$$\beta_i = \beta_u + \beta_u (1 - T_m) \frac{D}{E} \quad (22)$$

Dove:

β_i	=	parametro espressivo del rischio di un'impresa (β -levered);
β_u	=	parametro espressivo del rischio operativo di un'impresa (β -unlevered);

T_m	=	aliquota marginale d'imposta dell'impresa analizzata;
D	=	Debiti (<i>Debt</i>);
E	=	Mezzi propri o capitale netto (<i>Equity</i>);

Il modello *Capm* stima il rendimento atteso dagli investitori dal lato della domanda, cioè considerando il rendimento atteso dagli investitori stessi in funzione del tasso a remunerazione di investimenti privi di rischio, incrementato di un premio per il rischio.

6. Un ulteriore approfondimento dell'approccio dei flussi di cassa scontati

Al metodo *Eva* si aggiunge il metodo del Discounted cash flow (*Dcf*), (Gua- tri A., Bini M., pag. 550, op. cit.), modello indicato come approccio metodologi- camente corretto per la stima del valore d'impresa avendo come base di partenza i flussi di cassa attesi. Nel modello si procede allo sconto dei flussi di cassa (*Ufcf*) al costo medio ponderato del capitale (*Wacc*). Detta formulazione è analoga al Van, considerando come flussi di cassa i flussi di *Ufcf*, e scontando detti flussi sulla base del *Wacc*:

$$Ev_0 Dcf = \sum_{t=0}^n \frac{Ufcf_t}{(1 + Wacc)^t} \quad (23)$$

Dove:

$Ev_0 Dcf$	=	valore dell'impresa al tempo 0 sulla base della metodologia <i>Dcf</i> ;
$Ufcf_t$	=	unlevered free cash flow al tempo t.

Il modello suggerisce come la creazione di valore risieda nella capacità del- l'impresa di sviluppare investimenti con rendimenti superiori al costo medio ponde- rato del capitale. La metodologia può prevedere anche la considerazione di un valore terminale V_t (Terminal value) da sommare ai flussi di cassa scontati, in caso di un rilevante peso della componente patrimoniale dell'impresa o dell'investimento da analizzare. La metodologia *Dcf* è classificata tra le valutazioni definite *asset side* cioè valutazioni che hanno a riferimento il valore dell'impresa (*Ev*). Per giungere al calco- lo del capitale economico dell'impresa, valutazioni definite *equity side*, è necessario sommare algebricamente a *Ev* la posizione finanziaria netta. Infatti, la metodologia *Dcf* calcola *Ev* sulla base di flussi di cassa unlevered, cioè che non considerano i flussi di denaro in uscita per il pagamento degli oneri finanziari e la restituzione del- l'indebitamento finanziario, prescindendo quindi dalla valutazione della posizione finanziaria netta.

Da notare come il modello di stima del valore basato sul metodo *Eva* è coe- rente con quanto espresso dalla metodologia *Dcf*. La valutazione di un impresa o di un investimento sulla base del metodo *Eva* (Pavarani E., pag. 378, op. cit.) determina il medesimo risultato in termini di valore attuale di una valutazione effettuata scon- tando i flussi di cassa:

$$Ev_0 Dcf = \sum_{t=1}^n \frac{Ufcf_t}{(1+Wacc)^t} = CI_0 + \sum_{t=1}^n \frac{Eva_t}{(1+Wacc)^t} \quad (24)$$

Dove:

CI_0 = capitale investito al tempo di avvio (0) dell'analisi.

Questa metodologia di stima prevede che i flussi di cassa siano scontati avendo come riferimento il costo medio ponderato del capitale (*Wacc*) mentre la letteratura prevede anche un'ulteriore metodologia secondo cui lo sconto dei flussi di cassa avviene sulla base di un tasso di sconto *k*, calcolato come indicato precedentemente.

Sebbene l'*Eva* non sia pari al *Ufcf* esiste un legame tra le due grandezze (e tra le modalità di valutazione). Infatti, il valore attuale degli *Eva* futuri, definito Market value added, cioè *Mva*® è pari al valore attuale netto dei flussi di cassa. Il *Van* ed il *Mva* di un progetto di investimento coincidono, ma il *Mva* permette di attribuire ad ogni esercizio la relativa performance. Alcuni autori giudicano tuttavia che detta formulazione sia da sottoporre a verifica in quanto il *Nopat* si differenzia dal flusso di cassa in quanto risente, per metodologia di calcolo, dell'utilizzo di valori derivati dalla contabilità, e non puri flussi di cassa. Inoltre, in considerazione delle difficoltà operative e informative relative al raccordo tra risultati finanziari ed economici, si rileva come le metodologie *Eva* e *Dcf* portino sovente a risultati differenti.

7. Sostenibilità del ciclo aziendale

Le metodologie di verifica della sostenibilità del ciclo aziendale integrano le valutazioni effettuate con le metodologie di tipo finanziario, al fine della determinazione della sostenibilità finanziaria dei progetti di investimento e del ciclo aziendale in generale. Queste metodologie sono tipicamente utilizzate anche nelle valutazioni delle operazioni di project financing, cioè quella tipologia di operazioni di finanziamento la cui caratteristica è la valutazione della capacità del progetto di generare cash flow per il rimborso del debito in assenza di garanzie di terzi. La valutazione si fonda quindi sulle sole capacità di rimborso del debito contratto e non sulla metodologia tradizionale di concessione del credito previo rilascio di garanzie.

La sostenibilità di un progetto di investimento è misurata con riferimento alla capacità del progetto di generare flussi di cassa adeguati rispetto al servizio del debito. Al riguardo (Albisetti R., pag. 121, op. cit.) la letteratura propone due metodologie, cioè il Debt service cover ratio (*Dscr*) ed il Loan life cover ratio (*Llcr*).

Il *Dscr* esprime il rapporto tra il flusso di cassa (*Ufcf*) e il servizio del debito totale dell'anno (quota capitale del debito e interessi sul debito):

$$Dscr = \frac{Ufcf_t}{K_t + I_t} \quad (25)$$

Dove:

Dscr = debt service cover ratio;

Ufcf_t = unlevered free cash flow al tempo *t*;

K_t = quota capitale del debito al tempo *t*;

I_t = interessi sul debito al tempo t.

Nel caso in cui si intenda calcolare il *Dscr* medio per tutto il periodo di analisi si procede (Albisetti R., pag. 121, op. cit.) alla definizione Average debt service cover ratio (*Adscr*), cioè la media dei *Dscr* rilevati nel complesso del periodo di analisi:

$$Adscr = \frac{\sum_{t=1}^n Dscr}{n} \quad (26)$$

Dove:

Adscr = average debt service cover ratio;

n = numero dei periodi di analisi.

Da notare, peraltro, come la formulazione dell'*Adscr* non preveda attualizzazione dei flussi di cassa, ma esprima una media aritmetica semplice dei *Dscr* dei diversi anni.

Il *Llcr* (Albisetti R., pag. 126, op. cit.) esprime il rapporto tra il valore attuale netto dei flussi di cassa che si generano nel periodo di vita del finanziamento e il valore attuale del debito, ed è quindi il quoziente tra la somma attualizzata al tasso di interesse del debito, dei flussi di cassa operativi tra l'istante di valutazione e l'ultimo anno per il quale è previsto il rimborso del debito, incrementata della riserva di cassa per il servizio del debito e il debito residuo allo stesso istante di valutazione:

$$Llcr = \frac{\sum_{t=s}^{s+m} \frac{Ufcf_t}{(1+k)^t} + R_t}{D_t} \quad (27)$$

Dove:

Llcr = loan life cover ratio;

s = periodo di valutazione;

s + m = ultimo periodo di rimborso del debito;

Ufcf_t = unlevered free cash flow al tempo t;

D_t = debito residuo al tempo t;

k = tasso di attualizzazione dei flussi di cassa;

R_t = eventuale riserva di cassa accumulata per il servizio del debito al tempo t.

Gli indici sopra indicati danno indicazioni sulla valutazione di sostenibilità degli investimenti dal punto di vista della capacità di rimborso del debito contratto per la realizzazione dell'investimento stesso, integrando quindi le metodologie di valutazione precedentemente esposte con indicazioni in merito alla sostenibilità dell'indebitamento.

8. Proiezione dei valori correlate alle valutazioni

Nel quadro della valutazione assume un ruolo importante l'analisi della sostenibilità delle ipotesi assunte nelle proiezioni (assumption). Possiamo distinguere tra valori economici W_e e valori potenziali W_p . I valori economici fanno riferimento a risultati reddituali attesi sulla base delle capacità già acquisite e perciò risultati di più probabile raggiungimento nel breve termine. Il valore potenziale è caratterizzato dal riferimento a flussi attesi nel lungo termine, tanto in termini di flussi reddituali quanto in termini di flussi finanziari. In questo caso la componente di breve termine è prevista in modo analitico, tuttavia assume un peso inferiore rispetto al valore di lungo termine, che è dato dal valore terminale. Il valore potenziale è distinto in valore delle attività in essere e valore delle opportunità di crescita. In questo caso il valore delle attività in essere corrisponde al valore economico.

I criteri più accreditati per la valutazione delle imprese fanno riferimento sia ai flussi attesi nel medio lungo termine, sia ai rischi futuri che si riflettono sui tassi di attualizzazione. La quantificazione di queste grandezze tuttavia richiede una capacità di previsione della cui accuratezza ed attendibilità risente la stima. Peraltro, le stime del capitale economico, in quanto legate a capacità reddituali già acquisite o probabili nel loro raggiungimento nel breve termine risentono in misura minore della aleatorietà della previsione. Le difficoltà di stima sono massime nella valutazione della componente potenziale del valore, legata alle attese di flussi reddituali o finanziari proiettate nel medio lungo periodo, generalmente oltre il periodo di valutazione analitica.

Relativamente alle modalità di effettuazione delle previsioni si distinguono due diverse e contrapposte metodologie: la metodologia burocratico convenzionale e la metodologia efficiente.

La proiezione burocratico convenzionale è il "più serio pericolo incombente sulla validità e sulla credibilità di tutti i modelli fondati sulle attese dei flussi futuri", (Guatri L., Bini M., pag. 73, op. cit.). La metodologia procede per ipotesi e formule semplificatrici atte ad agevolare il rapido svolgimento dei calcoli, partendo da alcuni elementi di base (previsione delle vendite, previsione degli investimenti ecc) e da questi sviluppando poi il complesso delle variabili relative allo sviluppo dell'attività d'impresa:

$$S_t = S_{t-1}(1 + g) \quad (28)$$

Dove:

S = vendite (sales);
 g = tasso di crescita.

Questa formulazione (Guatri L., Bini M., pag. 74, op. cit.) esprime le vendite al tempo t (S_t) in funzione delle vendite al tempo $t-1$ (S_{t-1}) ed in funzione di una tasso (g) di crescita. Gli elementi negativi del flusso sono poi quantificati sulla base di percentuali applicate al valore delle vendite in misura fissa. In alcuni casi tutti i costi relativi alla produzione sono stimati mediante il calcolo del margine di profitto sulle vendite, da cui è dedotto un tasso espressivo degli oneri fiscali. Relativamente alla

stima delle variazioni del capitale fisso (Cf), è adottata (Guatri L., pag. 75, Bini M., op. cit.) la seguente espressione:

$$Cf = \frac{\Delta Cf}{\Delta S} \quad (29)$$

Dove:

Cf	=	capitale fisso;
S	=	vendite (sales);
Δ	=	variazione annuale.

Allo stesso modo (Guatri L., Bini M., pag. 75, op. cit.) è assunto per convenzione, a volte, il legame tra fatturato e capitale circolante (Cc), dove Δ esprime la variazione annuale:

$$Cc = \frac{\Delta Cc}{\Delta S} \quad (30)$$

Dove:

Cc	=	capitale circolante.
------	---	----------------------

Anche in questo caso la variazione annuale si assume costante, ad eccezione delle situazioni in cui siano già prevedibili politiche di gestione del capitale circolante. Quando la previsione degli investimenti in capitale fisso ed in capitale circolante è effettuata mediante i coefficienti Cf e Cc il fabbisogno finanziario per gli investimenti nel periodo t è il seguente:

$$\Delta I_t = (S_t - S_{t-1}) (Cf_t - Cc_t) \quad (31)$$

Dove:

I_t	=	investimenti (capitale investito) al tempo t .
-------	---	--

A questa metodologia (Guatri L., Bini M., pag. 75, op. cit.) è da preferire la presenza di un piano formalizzato e approvato da un organo competente, che ne assuma la responsabilità. Si tratta quindi di procedere alla valutazione avendo a disposizione piani di sviluppo d'impresa di medio lungo termine, inseriti in un processo di pianificazione formale, secondo la metodologia efficiente di effettuazione delle previsioni. L'affidabilità delle assunzioni di base (assumption) è l'elemento fondamentale di attendibilità di un piano. Gli elementi sono analizzati avendo riguardo alla normalizzazione dei dati aziendali, con riferimento alla redistribuzione nel tempo dei ricavi e costi straordinari, alla eliminazione di ricavi e costi estranei alla gestione ed alla correzione della distorsione derivante da politiche fiscali sui dati di bilancio.

Anche in presenza di un piano d'impresa condiviso, il rischio connesso all'incertezza della previsione è un elemento da considerare nella affidabilità delle valutazioni. Al fine della misurazione dell'incertezza delle previsioni sono utilizzate due misure fondamentali della statistica descrittiva, la media e la deviazione standard. Una prima metodologia di stima del rischio (Pavarani E., pag. 427, op. cit.) consiste nell'analisi del rendimento medio atteso:

$$R^* = \sum_{s=1}^n P_s R_s \quad (32)$$

Dove:

R^*	=	rendimento medio atteso dell'investimento;
s	=	scenario;
n	=	numero degli scenari;
P_s	=	probabilità associata allo scenario s ;
R_s	=	rendimento del progetto associato allo scenario s .

La qualità del rendimento è data dalla misura della variabilità dei valori rispetto al valore medio atteso identificato. In considerazione del fatto che la varianza esprime una dispersione rispetto ad un valore medio atteso, all'aumentare (Pavarani E., pag. 427, op. cit.) del valore della varianza aumenta il rischio connesso al progetto:

$$\sigma_i^2 = \sum_{s=1}^n P_s (R_s - R^*)^2 \quad (33)$$

Dove:

σ_i^2	=	varianza del rendimento atteso dell'investimento i -esimo.
--------------	---	--

Al fine di esprimere la rischiosità di un investimento nella medesima unità di misura dell'investimento stesso si introduce (Pavarani E., pag. 428, op. cit.) il concetto di deviazione standard (σ_i):

$$\sigma_i = \sqrt{\sigma_i^2} \quad (34)$$

Il rapporto tra deviazione standard e rendimento medio atteso definisce (Pavarani E., pag. 428, op. cit.) il coefficiente di variazione (CV):

$$CV = \frac{\sigma_i}{R^*} \quad (35)$$

Il coefficiente di variazione esprime la quantità di rischio per unità di rendimento. Tuttavia, permangono limiti impliciti alla soggettività legata all'attribuzione delle probabilità degli scenari e quindi detti strumenti di valutazione del rischio sono appropriati nelle situazioni in cui la previsione degli scenari è certa o non assume un ruolo determinante. Al riguardo è da notare come in un'alternativa di scelta tra diversi progetti di investimento si può considerare non solo il progetto caratterizzato dal valore maggiore, ma anche quello con più elevata probabilità. Si procede quindi alla stima della probabilità connessa ai diversi scenari con una specifica metodologia di stima. Tra queste è il caso di considerare la metodologia definita Simulazione Montecarlo. Il metodo permette (Pavarani E., pag. 436, op. cit.) di considerare tutte le possibili combinazioni delle variabili rilevanti, tracciando una distribuzione di frequenza dei valori generati:

$$Van^* = \sum_{i=1}^n Van_i f_i \quad (36)$$

Dove:

Van^*	=	valore attuale netto medio atteso dalla simulazione;
i	=	valore i-esimo della simulazione;
f_i	=	frequenza relativa al Van i-esimo.

La metodologia, pur imponendo una riflessione sulle variabili rilevanti del piano, presenta dei limiti, tra cui la mancata considerazione dell'interdipendenza tra le variabili considerate, e quindi, anche in questo caso, deve essere considerata metodologia che fornisce indicazioni ma che è comunque derivante da un procedimento statistico.

9. Inquadramento del caso aziendale

La verifica della significatività delle analisi proposte è stata eseguita su un'impresa di trasformazione delle carni, in specifico un prosciuttificio attivo nella provincia di Parma. Si tratta di un comparto importante nel sistema economico provinciale, caratterizzato dalla presenza di numerose imprese della trasformazione agroalimentare, tra cui spicca il comparto della lavorazione delle carni suine.

Queste imprese operano principalmente nella trasformazione della coscia fresca di suino in prosciutto di Parma Dop, oltre alla produzione di altri salumi, tra cui i prosciutti "esteri", cioè prosciutti derivanti dalla lavorazione di cosce di suini aventi caratteristiche e/o origine non corrispondenti al disciplinare di produzione del Prosciutto di Parma Dop, per una strategia di differenziazione delle produzioni e pieno utilizzo della capacità produttiva degli impianti. Si tratta di un comparto caratterizzato dalla necessità di investimenti di rilievo per impianti e macchinari, cui si collegano spesso problemi di sottocapitalizzazione, amplificati anche dal lungo periodo di stagionatura del prosciutto, che determina necessità di finanziamenti anche per la copertura finanziaria del ciclo del capitale circolante.

La situazione congiunturale del comparto appare negli ultimi anni poco favorevole, a motivo di aumenti di costi, in particolare per acquisto della materia prima (coscia suina fresca), che da sola rappresenta oltre il 50% del totale dei costi di produzione (Bonazzi G., pag. 23, op. cit.) cui non seguono apprezzamenti di mercato in termini di prezzo di vendita del prosciutto stagionato. Infatti, le aziende del comparto dei prosciuttifici scontano il potere contrattuale dei clienti, in particolare catene della distribuzione, e dei fornitori, macellatori in primo luogo. È anche da rilevare come l'ingresso nel comparto di alcuni grandi gruppi della trasformazione agroalimentare stia accelerando il processo di uscita dal mercato delle piccole aziende a connotazione artigianale. Si tratta sovente di imprese a conduzione familiare, spesso non in grado di usufruire di economie di scala produttive e finanziarie, e che non sempre sono in grado di remunerare gli investimenti necessari per operare sul mercato, ed i relativi costi di gestione, ai fini della produzione del prosciutto di Parma.

Queste situazioni di mercato rendono importante una riflessione in merito alla valutazione degli investimenti effettuati dalle imprese nel comparto. In tale contesto il lavoro ha avuto come riferimento la valutazione degli investimenti di un'impresa operante nel comparto dei prosciuttifici, che ha avviato ex novo l'attività.

10. Conto economico e stato patrimoniale del caso aziendale

L'impresa analizzata ha compiuto investimenti in terreni, fabbricati, macchinari ed impianti per la lavorazione della coscia fresca di suino per la produzione di prosciutto di Parma Dop. La lavorazione avviene sia su coscia di proprietà, sia su coscia di terzi, come servizio di lavorazione. Gli investimenti realizzati dall'impresa sono finalizzati all'innovazione del ciclo di produzione, e al contenimento dei costi di gestione, per effetto dell'utilizzo di tecnologie che consentono di diminuire i tempi di lavorazione e gli scarti di prodotto finito. Gli investimenti effettuati hanno infatti permesso di automatizzare buona parte del ciclo produttivo, e sono stati finanziati in parte con capitale proprio, ed in parte mediante accensione di finanziamenti bancari a medio lungo termine, in forma tecnica di mutui ipotecari.

Per quanto riguarda i tempi di realizzazione degli investimenti, questi sono stati effettuati nell'anno di costituzione dell'impresa, mentre nel primo biennio di attività è stato portato a regime il potenziale produttivo dell'impresa. Sulla base dei dati disponibili il potenziale di lavorazione dello stabilimento è di circa 4mila cosce di suino per settimana, pari ad un potenziale di lavorazione annuo di circa 200mila cosce di suino. In considerazione della buona dotazione iniziale di strutture non sono stati giudicati necessari ulteriori investimenti negli anni futuri, ad eccezione del mantenimento degli impianti realizzati in sede di avvio dell'attività d'impresa.

L'impresa ha forma giuridica di società di capitali, con conseguente obbligo annuale di redazione e deposito del bilancio d'esercizio presso il Registro delle Imprese. Il bilancio d'esercizio, comprensivo di stato patrimoniale, conto economico e nota integrativa, e completo degli allegati, quali verbale assembleare di approvazione di bilancio, relazione sulla gestione e relazione del collegio sindacale, è la base delle analisi condotte.

Per quanto riguarda l'orizzonte temporale, l'analisi ha interessato una serie storica ventennale. Il primo quinquennio di analisi è composto da dati storici, dall'anno 2001 al 2005, ultimo anno in cui il bilancio d'esercizio è disponibile per la consultazione ai terzi presso il Registro delle Imprese. Il restante periodo di analisi è composto di dati stimati. Le stime sono state effettuate mediante predisposizione di un piano di sviluppo industriale. Le previsioni dei prezzi di vendita sono state effettuate facendo riferimento agli attuali prezzi di mercato del prosciutto e sulla base dei contratti in essere. Le previsioni di prezzi sono state assunte a valori costanti, senza considerare effetti inflattivi. I costi di acquisto sono stati stimati sulla base della situazione attuale di costo, desunta dalla contabilità aziendale e sulla base dei contratti in essere. I costi variabili sono stati fatti variare sulla base dell'aumento del volume della produzione attraverso moltiplicatori, quali il numero dei prosciutti lavorati ed il numero dei prosciutti commercializzati. Anche le previsioni di costo non tengono in considerazione effetti inflattivi. Le stime relative ai dati patrimoniali hanno con-

siderato l'adeguatezza della dotazione iniziale di investimenti in relazione alle stime di produzione, senza necessità quindi di prevedere ulteriori investimenti in attività immobilizzate. Il ciclo del capitale circolante è stato stimato sulla base delle stime relative ai tempi di rotazione del magazzino, delle dilazioni sui crediti commerciali e delle dilazioni sui debiti di fornitura. Le stime relative ai dati patrimoniali hanno considerato anche i dati relativi all'indebitamento a medio lungo termine verso banche, derivati dai piani di ammortamento dei mutui contratti dall'impresa, ricostruiti sulla base dei dati contenuti nelle note integrative che formano parte integrante dei bilanci relativi ai diversi anni di analisi. È stato previsto il reinvestimento degli utili e non sono stati previsti incrementi di capitale sociale mediante nuovi conferimenti.

Ai fini dell'applicazione delle metodologie di valutazione precedentemente descritte, il dato di partenza è il bilancio d'esercizio riclassificato, sulla base della metodologia di riclassificazione definita a valore aggiunto, per quanto riguarda il conto economico civilistico, e sulla base della metodologia di riclassificazione definita a liquidità ed esigibilità, per quanto riguarda lo stato patrimoniale. I dati di flusso finanziario sono stati ricostruiti, in sede storica e previsionale, mediante predisposizione del rendiconto finanziario.

Per i dati economici, il punto di partenza è dato dal valore dei ricavi delle vendite e delle prestazioni, voce che esprime il fatturato dell'impresa. Il fatturato annuo è pari in media a 3,391 milioni di Euro annui nel ventennio. Il fatturato incide mediamente per il 94,09% del valore della produzione, comprendendo in tale aggregato, in ossequio al dettato civilistico, la variazione del magazzino di prodotti in corso di lavorazione, semilavorati e prodotti finiti, cioè beni che subiscono trasformazione interna all'impresa. Il valore della produzione è pari in media a 3,606 milioni di Euro annui nel ventennio. I costi esterni della produzione sono pari in media a 1,994 milioni di Euro annui nel ventennio. Per sottrazione dei costi esterni di produzione al valore della produzione si determina il valore aggiunto, che evidenzia il valore generato dalle trasformazioni effettuate dall'impresa, cioè il margine disponibile per la remunerazione dei fattori interni di produzione. Il valore aggiunto è pari al 44,66% del valore della produzione in media nel ventennio. Sottraendo dal valore aggiunto i costi per la remunerazione dei fattori interni di produzione, dati dal personale dipendente e dagli accantonamenti per rischi e dagli altri accantonamenti, si ottiene il Margine operativo lordo (Mol), definito in terminologia anglosassone Ebitda. Il Mol è pari al 35,06% del valore della produzione in media nel ventennio. Sottraendo dal Margine operativo lordo gli ammortamenti e le svalutazioni, e sommando algebricamente il saldo delle gestione accessorie, cioè la somma algebrica delle voci del conto economico civilistico "altri ricavi e proventi", con segno positivo, e "oneri diversi di gestione", con segno positivo, si perviene alla determinazione del reddito operativo, definito in terminologia anglosassone Ebit. Il reddito operativo è pari al 27,59% del valore della produzione nella media del ventennio.

La riclassificazione del conto economico a valore aggiunto evidenzia come il saldo della gestione finanziaria incide per il 6,67% del valore della produzione, nella media del ventennio. Il risultato d'esercizio è positivo in media nel ventennio per il 18,90% del valore della produzione.

Per quanto riguarda l'analisi dei dati patrimoniali dell'impresa oggetto di

analisi, emerge come questa abbia effettuato, dall'avvio dell'attività, investimenti in attività immobilizzate pari al 54,18% degli investimenti effettuati in impresa in media. Si tratta di investimenti necessari per automatizzare il ciclo produttivo e ridurre i costi unitari di lavorazione e stagionatura del prosciutto di Parma Dop.

Gli investimenti in attività a breve sono pari, in media nel ventennio considerato, al 45,82% degli investimenti effettuati in impresa. È da notare come l'impresa oggetto di analisi svolga anche attività di lavorazione e stagionatura di carni di proprietà, e quindi il peso del magazzino è determinato dalla presenza a magazzino a fine esercizio di cosce fresche che, in quanto di proprietà dell'azienda, sono inserite tra le voci del bilancio civilistico.

Per quanto riguarda il passivo di stato patrimoniale, questo è stato suddiviso in mezzi propri di finanziamento (patrimonio netto) e mezzi di terzi di finanziamento. In media, nel ventennio oggetto di analisi, i mezzi propri rappresentano il 24,77% delle fonti di finanziamento dell'impresa, mentre i mezzi di terzi rappresentano il 75,23% delle fonti di finanziamento dell'impresa.

I mezzi di terzi a breve rappresentano il 53,51% delle fonti di finanziamento dell'impresa, infine dal calcolo emerge come i mezzi di terzi consolidati sono il 21,72% delle fonti di finanziamento dell'impresa. Al riguardo è da notare una contrazione nel corso del periodo di analisi dei mezzi di terzi consolidati, per effetto del rimborso delle quote di capitale dei mutui destinati a finanziare gli investimenti in attività immobilizzate effettuati in sede di avvio dell'attività d'impresa.

11. La valutazione degli investimenti applicata al caso aziendale

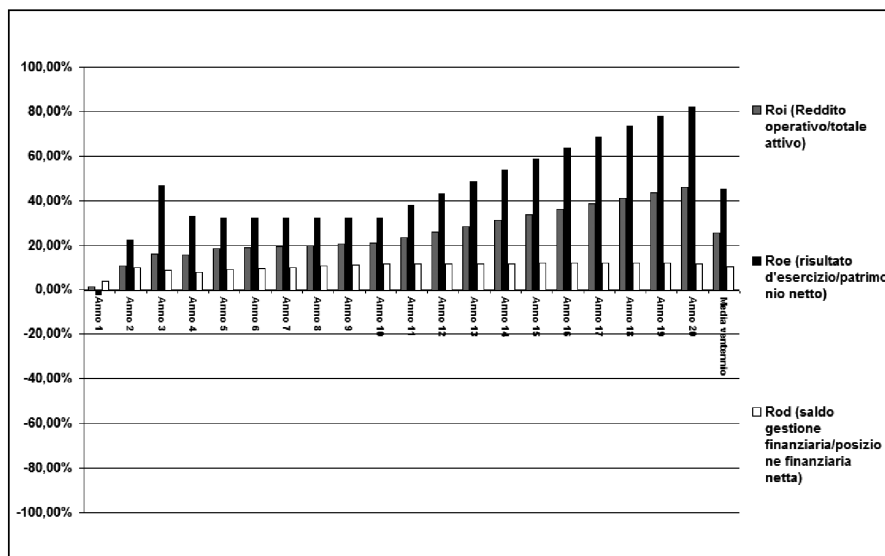
Nella valutazione degli investimenti applicata al caso aziendale, il punto di partenza è dato dai metodi tradizionali di valutazione degli investimenti.

Per quanto riguarda il *Roi*, calcolato sulla base della (2), questo assume un valore medio per il ventennio di analisi del 25,55%. Tuttavia, la formula del *Roi* d'ugual peso ai risultati economici dei diversi periodi.

Stessa considerazione vale per il *Roe*, che evidenzia una redditività molto elevata dei mezzi propri apportati dall'imprenditore. Infatti, il *Roe*, calcolato sulla base della (3), assume un valore medio per il ventennio di analisi del 45,03%. Anche in questo caso il valore medio dell'indice è crescente nel tempo. Emerge quindi una situazione di redditività elevata e crescente nel tempo dal calcolo degli indici di derivazione contabile.

È stato poi messo a confronto il *Roi* con il *Rod*, indice espressivo del costo dell'indebitamento. Il confronto tra *Roi* e *Rod* evidenzia come il costo dell'indebitamento sia inferiore rispetto alla redditività operativa dell'impresa. Il *Rod* calcolato sulla base della (4) assume un valore medio per il ventennio di analisi del 10,59%. In questa situazione, l'aumento degli investimenti finanziati con debito bancario determina un miglioramento degli esiti complessivi di gestione.

Emerge quindi come gli investimenti effettuati nel prosciuttificio analizzato siano in grado di generare un risultato della gestione operativa in grado di generare una redditività superiore al costo finanziario dell'indebitamento necessario per effettuare gli investimenti.

Grafico 1: Andamento annuale *Roi*, *Roe*, *Rod*

Fonte: Elaborazioni su dati aziendali

Inoltre, si rileva come, nel caso del prosciuttificio analizzato, investimenti di miglioramento della gestione operativa siano in grado di generare redditi superiori al costo del loro finanziamento.

L'analisi effettuata con riferimento ai soli indici di derivazione contabile non tiene tuttavia in considerazione il fattore tempo, e la distribuzione nel tempo dei flussi finanziari e di reddito. Il valore medio degli indici è crescente nel tempo ma, tuttavia, non si ha attualizzazione dei risultati economici.

Per quanto riguarda il Pay back period attualizzato (*Pbpa*) detto indice esprime una prima considerazione dell'elemento tempo nell'effettuazione degli investimenti. Nel caso aziendale oggetto di analisi il *Pbpa*, calcolato sulla base della (14), assume valore pari a 19,27 ed indica come i portatori di capitale necessitino di un tale lasso temporale per il recupero dell'investimento effettuato.

Da notare come la formulazione proposta del *Pbpa* privilegia un approccio di tipo finanziario, con riferimento ai flussi di cassa in entrata ed in uscita.

Una formulazione alternativa è altresì possibile, avendo riferimento agli apporti di capitale netto o proprio, per effettuazione dell'investimento iniziale in termini di flusso in uscita F_0 . I flussi in entrata nei vari anni F_t , da 1 a *Pbpa*, possono essere considerati il dividendo agli azionisti, oppure ancora il reddito operativo, relativi ai diversi anni. Detta metodologia privilegia tuttavia un approccio di tipo reddituale che è giudicato approccio minoritario dalla letteratura.

Si è quindi proceduto alla valutazione degli investimenti effettuati nell'impresa analizzata con metodologie di stima fondate sui flussi di cassa. In primo luogo è stato calcolato il *Van* dell'investimento in impresa, che permette di valutare il valore

attuale netto del complesso degli investimenti effettuati. La formulazione proposta considera i flussi finanziari in entrata ed in uscita rilevati nel ventennio di analisi, scontati ad un tasso k pari al costo del debito di 5,896%, dato dalla somma di un tasso risk free pari al 2,771%, derivato dai titoli di stato a medio lungo termine, aumentato di uno spread a premio del rischio pari al 3,125% derivato dai dati medi di settore di fonte Datastream. Il Van del progetto, calcolato sulla base della (15), è positivo per circa 381mila Euro, su orizzonte di pianificazione a vent'anni. Si rileva quindi che gli investimenti effettuati dal prosciuttificio in sede di avvio dell'impresa abbiano un valore attuale netto positivo su un orizzonte ventennale di analisi, pur considerando un $Pbpa$ quasi pari al periodo di analisi. In una situazione del comparto caratterizzata dalla cessazione di un numero elevato di aziende, gli investimenti effettuati dal prosciuttificio analizzato consentono quindi di generare risultati dell'investimento positivi.

Nell'ambito delle valutazioni basate sui flussi si è poi proceduto al calcolo del Tir , calcolato sulla base della (17), che risulta positivo e pari allo 0,81%. Emerge quindi che il Tir è superiore al tasso di sconto k , ma il Tir stesso è modesto. L'investimento è quindi sostenibile ed in grado di liberare flussi di cassa, ma su livelli di poco superiori a zero.

Per quanto riguarda il valore dell'impresa si è poi proceduto applicando la metodologia Dcf . La differenza rispetto al Van deriva dal fatto che la metodologia Dcf prevede che l'attualizzazione dei flussi di cassa futuri avvenga sulla base del $Wacc$. Detto parametro, calcolato sulla base della (19), nel caso aziendale analizzato varia da 5,35% a 5,54% per anno. Da notare come la variazione del $Wacc$ per anno derivi dalla diversa composizione percentuale del valore complessivo dell'impresa V in termini di somma di valore di mercato del debito D e valore di mercato dei mezzi propri E . Nella formula, il costo del capitale di terzi Kd , calcolato sulla base della (20), è stato calcolato pari al costo del debito di 5,896%, dato da un tasso risk free R_f del 2,771% derivato dai titoli di stato a medio lungo termine aumentato di uno $Spread_i$ a premio del rischio pari al 3,125% derivato dai dati medi di settore di fonte Datastream. L'aliquota di imposizione marginale T_m è del 37,25% sulla base dell'imposizione Ires e Irap con aliquote del 33,00% e del 4,25%, anche se al riguardo è opportuno considerare la differente base imponibile delle due imposte. Il costo del capitale proprio Ke , calcolato sulla base della (21), è stato calcolato pari al costo del debito di 5,646%, dato da un tasso risk free R_f del 2,771% derivato dai titoli di stato a medio lungo termine aumentato del Mrp a premio del rischio pari al 3,125% derivato dai dati medi di settore di fonte Datastream, moltiplicato questo per il coefficiente β .

Da notare come, secondo le indicazioni della letteratura, $Spread_i$ e Mrp coincidono. Per il calcolo del Ke , il β_p parametro espressivo del rischio di un'impresa è stato calcolato sulla base della (22).

Il β_u è indicato pari a 0,92 su dato derivante da medie di settore di fonte Datastream. Sulla base di detti dati di base, il β_i varia da 2,57 a 4,17 nei diversi anni, sulla base delle variazioni del rapporto tra D ed E . Di conseguenza il Ke varia da 10,793% a 15,828%.

Il $Wacc$ così calcolato è inferiore quindi al tasso k utilizzato per l'attualizzazione dei flussi di cassa del Van e di conseguenza, l' Ev_{Dcf} , calcolato sulla base della (23), è superiore al Van ed è pari a 553mila Euro, a conferma della bontà dell'investi-

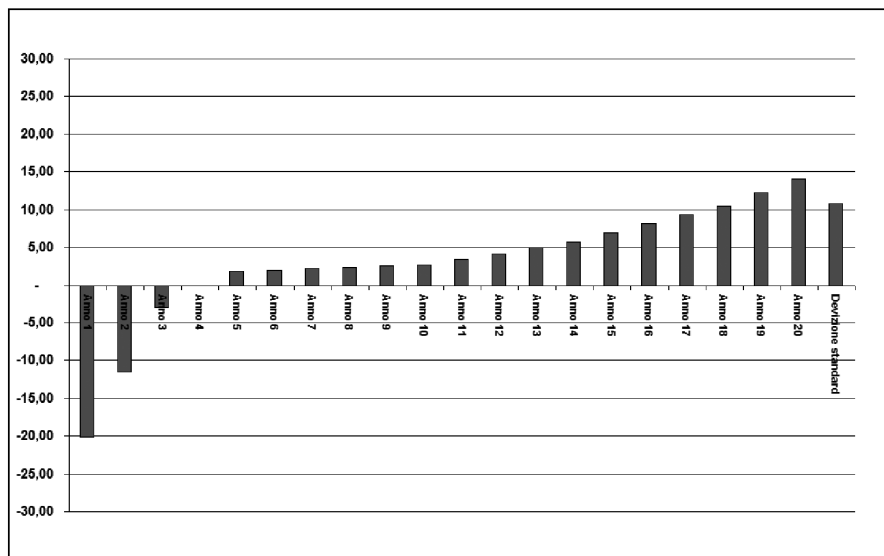
mento effettuato in impresa. Emerge tuttavia come la scelta del tasso di attualizzazione, ed in particolare la sua stima nel medio lungo periodo in presenza di incertezza, sia elemento fondamentale nella valutazione e, tuttavia, detta scelta si fonda su un grado elevato di soggettività ed aleatorietà.

Da notare come alcuni autori, al fine dell'equivalenza delle due metodologie, attualizzino i flussi di cassa utilizzati per il calcolo del *Van*, utilizzando non il tasso k ma il tasso *Wacc*.

Peraltro, sia la formulazione del *Van*, sia la formulazione dei *Dcf*, presentano una difficoltà di stima del valore residuo dell'investimento V_t che è risolta operativamente ampliando la serie storica di pianificazione, ma che rappresenta tuttavia un problema di metodo. Infatti i valori emergenti dalle valutazioni includono una serie di dati aziendali di 20 anni, ma non considerano gli importanti valori patrimoniali terminali (Terminal value) che in situazioni di aziende di non grande dimensione, o caratterizzate da investimenti immobiliari rilevanti, possono influire in modo anche decisivo sulla stima del valore di un'azienda.

Per quanto riguarda il *Dscr*, questo permette di valutare la sostenibilità del ciclo aziendale, su base annua, dal punto di vista della capacità del rimborso dell'indebitamento. Il valore K_t ed il valore I_t , espressivi del servizio annuo del debito, sono dati da quota capitale e quota interessi dei mutui contratti dall'impresa. Il valore medio del *Dscr*, calcolato sulla base della (19), è pari a 2,95 (cioè *Adscr*) in grado di sostenere l'indebitamento contratto per la realizzazione degli investimenti, grazie anche agli apporti di capitale effettuati dai soci in sede di realizzazione degli investimenti ed avvio dell'attività d'impresa, a copertura parziale degli investimenti effettuati.

Grafico 2: Andamento annuale *Dscr*

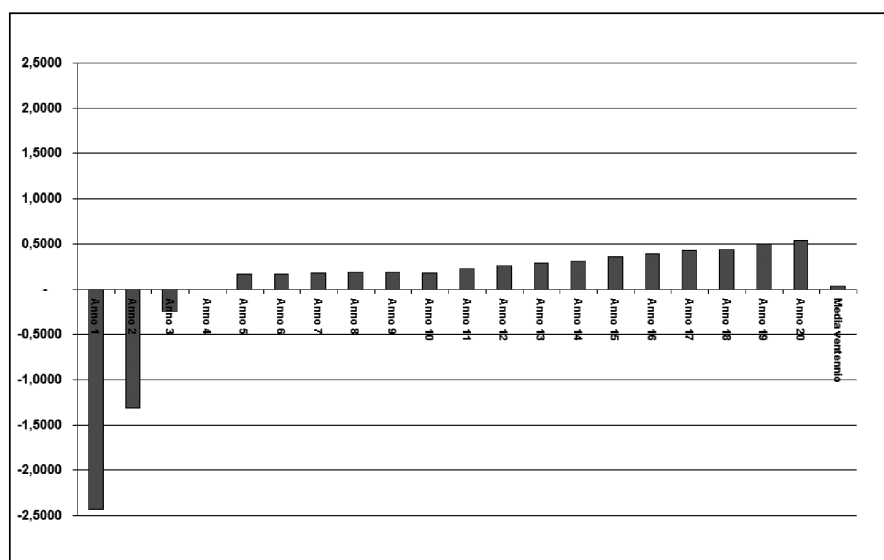


Fonte: Elaborazioni su dati aziendali

Dall'analisi della dinamica annua del *Dscr* emerge come questa sia differenziata in modo notevole e presenta un aumento del valore dell'indice nel corso del periodo di pianificazione, in considerazione di flussi di cassa crescenti (*Ufcf*).

L'*Llcr* permette di valutare il rapporto tra flusso di cassa attualizzato e debito residuo, la metodologia, che considera anche il peso del fattore tempo mediante attualizzazione, determina un valore, calcolato sulla base della (27), negativo all'avvio dell'investimento, ma progressivamente crescente, sino a valori superiori a 0,50. Il dato indica come i flussi di cassa attualizzati stimati per il complesso del periodo di pianificazione siano in grado di rimborsare progressivamente il debito contratto al tempo di avvio del progetto di investimento, dopo un primo triennio di flussi di cassa negativi. Al termine del periodo di analisi, i flussi di cassa sono pari ad oltre il 50% del debito residuo contratto per avviare gli investimenti nell'attività dell'impresa.

Grafico 3: Andamento annuale *Llcr*



Fonte: Elaborazioni su dati aziendali

Gli indici di sostenibilità dell'indebitamento indicano come nel prosciuttificio analizzato, che ha effettuato investimenti rilevanti in sede di avvio dell'attività d'impresa, i flussi di cassa di gestione, per effetto di risparmi di costo, siano superiori al servizio dell'indebitamento, anche in una situazione del comparto caratterizzata da una crisi di mercato significativa.

12. Conclusioni

Sulla base delle analisi emerge come il processo di valutazione dei progetti di investimento sia importante nella fase di valutazione delle opportunità e delle al-

ternative di investimento, sia ai fini interni, per guidare l'operato degli imprenditori e dei manager, sia ai fini esterni, per permettere la valutazione delle imprese.

Emerge altresì come le metodologie tradizionali di valutazione, fondate su valori di derivazione contabile (*Roi, Roe, Rod*), possano essere opportunamente integrate con metodologie di valutazione fondate sui flussi di cassa (*Pbpa, Van, Tir, Ev₀Dcf*), e con metodologie volte alla determinazione della sostenibilità del ciclo aziendale (*Dscr, Adscr, Llcr*). Si è provveduto inoltre ad analizzare ulteriori metodologie di valutazione delle imprese, al fine di ricavare il valore odierno di un'impresa o di un progetto di investimento (W_0) attualizzando i proventi che l'impresa genererà a favore dell'investitore, dividendi, flussi di cassa, redditi, secondo modelli reddituali o finanziari, in considerazione anche di un valore terminale (V_T), con ulteriore approccio al valore analizzando metodologie basate su valori contabili (*Eva*).

Nel processo di valutazione si deve considerare come le metodologie di valutazione dei flussi reddituali e finanziari si basano su previsioni di medio lungo termine e nelle metodologie di calcolo dei tassi di attualizzazione, pertanto, vi sono dei limiti in tema di soggettività della previsione, di scelta dei tassi, di previsione di scenario e di quantificazione del terminal value.

Le metodologie sviluppate nella parte teorica sono state applicate in parte ad un'impresa della lavorazione delle carni, in particolare un prosciuttificio. Sono stati calcolati indici di derivazione contabile (*Roi, Roe, Rod*), indici di valutazione degli investimenti basati sui flussi (*Pbpa, Van, Tir, Ev₀Dcf*), e indici di sostenibilità del ciclo aziendale (*Dscr, Adscr, Llcr*). L'analisi dimostra come un'impresa che ha effettuato investimenti per il miglioramento della gestione aziendale fa registrare risultati gestionali positivi. Questo emerge sia da metodologie tradizionali di valutazione, sia da metodologie di valutazione dei progetti di investimento basate sui flussi. Inoltre, sulla base del calcolo di indici di sostenibilità del ciclo aziendale, i flussi di cassa in entrata derivanti dalla gestione sono superiori ai flussi di cassa in uscita necessari per rimborsare capitale ed interessi del debito contratto per finanziare gli investimenti. L'analisi del caso aziendale evidenzia come le differenti metodologie di valutazione dei progetti forniscono risultati che devono essere considerati alla luce dei limiti e dei postulati di base dei diversi approcci di metodo. Ogni metodologia di stima evidenzia delle peculiarità specifiche e pertanto il giudizio complessivo dell'investimento può essere espresso attraverso il complesso delle metodologie di valutazione esaminate.

Tabella 1: Conto economico riclassificato

	Valori in Euro				Valori in percentuale			
	Media primo quinquennio	Media secondo quinquennio	Media terzo quinquennio	Media ventennio	Media primo quinquennio	Media secondo quinquennio	Media terzo quinquennio	Media ventennio
Fatturato	€ 1.683.117	€ 3.433.671	€ 3.936.512	€ 3.391.573	79,59%	96,21%	96,50%	94,09%
Valore della produzione	€ 2.114.696	€ 3.568.872	€ 4.079.203	€ 3.604.614	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Costi esterni della produzione	-€ 1.169.604	-€ 2.188.875	-€ 2.310.137	-€ 1.994.689	-55,31%	-61,33%	-56,63%	-55,34%
Valore aggiunto	€ 945.092	€ 1.379.997	€ 1.769.066	€ 2.345.545	44,69%	38,67%	43,37%	44,66%
EBITDA - MOL (margine operativo lordo)	€ 678.814	€ 1.020.482	€ 1.389.634	€ 1.966.113	32,10%	28,59%	34,07%	35,06%
EBIT - Reddito operativo	€ 430.400	€ 754.042	€ 1.108.434	€ 994.447	20,35%	21,13%	27,17%	36,19%
Saldo della gestione finanziaria	-€ 186.765	-€ 249.178	-€ 262.982	-€ 282.982	-8,83%	-6,98%	-6,45%	-6,67%
Risultato d'esercizio	€ 229.354	€ 457.554	€ 795.521	€ 1.372.000	10,85%	12,62%	19,50%	19,80%

Fonte: *Elaborazioni su dati aziendali*

Tabella 2: Stato patrimoniale riclassificato

	Valori in Euro				Valori in percentuale			
	Media primo quinquennio	Media secondo quinquennio	Media terzo quinquennio	Media ventennio	Media primo quinquennio	Media secondo quinquennio	Media terzo quinquennio	Media ventennio
Attivo a breve	€ 1.600.092	€ 2.593.725	€ 2.973.561	€ 2.644.100	38,92%	47,32%	47,32%	45,82%
Attivo immobilizzato	€ 2.511.608	€ 2.888.061	€ 3.311.001	€ 3.126.637	61,08%	52,68%	52,68%	54,18%
Totale attivo	€ 4.111.700	€ 5.481.786	€ 6.284.562	€ 5.770.737	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Mezzi di terzi a breve	€ 1.758.782	€ 2.678.084	€ 3.524.341	€ 4.389.418	42,78%	48,85%	56,08%	53,51%
Mezzi di terzi consolidati	€ 1.558.072	€ 1.381.015	€ 1.120.188	€ 945.594	37,89%	25,19%	17,97%	21,72%
Patrimonio netto	€ 794.846	€ 1.422.688	€ 1.631.032	€ 1.429.613	19,33%	25,95%	25,95%	24,77%
Totale passivo	€ 4.111.700	€ 5.481.786	€ 6.284.562	€ 5.770.737	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Fonte: *Elaborazioni su dati aziendali*

Tabella 3: Metodi tradizionali di valutazione degli investimenti

	Media primo quinquennio	Media secondo quinquennio	Media terzo quinquennio	Media quarto quinquennio	Media ventennio
ROI (reddito operativo/capitale investito)	12,48%	19,99%	28,60%	41,15%	25,55%
ROE (risultato d'esercizio/patrimonio netto)	26,35%	32,16%	48,49%	73,12%	45,03%
ROD (saldo della gestione finanziaria/posizione finanziaria netta)	8,03%	10,65%	11,78%	11,90%	10,59%

Fonte: Elaborazioni su dati aziendali

Tabella 4: Valutazioni basate sui flussi

	Valore
Pbpa	19,27
Van	€ 381.319,24
Tir	0,81%
EvDcf	€ 553.131,44

Fonte: Elaborazioni su dati aziendali

Tabella 5: Sostenibilità del ciclo aziendale

	Valore medio ventennio
Adscr	2,95

Fonte: Elaborazioni su dati aziendali

Bibliografia

1. Albiseti R. (2000), "*Finanza strutturata*", Etas, Milano.
2. Amaduzzi A. (2000), "*Obiettivi e valore dell'impresa: misure di performance*", Il Sole 24 Ore, Milano.
3. Andrei P., Fellegara A. (2006), "*Contabilità generale e bilancio d'impresa*", Giappichelli, Torino.
4. Bonazzi G. (2002), "*Aspetti della gestione delle imprese agroindustriali: il prosciuttificio in provincia di Parma*", supplemento a "*L'avvenire agricolo*", Anno 110, n. 6, Parma.
5. Bonazzi G., Iotti M. (2006), "*Analisi per indici nell'impresa agraria*", in Annali Facoltà Medicina Veterinaria di Parma, Anno XXV, 2005, Università degli Studi di Parma, Parma.
6. Bonazzi G., Iotti M., de Paolini E. (2006), "*La ristrutturazione gestionale in un'impresa agraria: l'analisi di un'impresa con zootecnia bovina da latte*", Collana Quaderni di Studio, Dipartimento di Salute Animale, Sezione Risorse del Territorio, Laboratorio di gestione e contabilità agraria, Università degli Studi di Parma, Parma.
7. Brealey R. A., Myers S. C., Sandri S. (2003), "*Principi di Finanza aziendale*", McGraw-Hill, Milano.
8. Copeland T., Koller T., Murrin J. (2004), "*Il valore dell'impresa*", Il Sole 24 Ore, Milano.
9. Damodaran A. (2002), "*Manuale di valutazione finanziaria*", Mc Graw-Hill, Roma.
10. Gallerani V., Zanni G., Viaggi D. (2004), "*Manuale di Estimo*", McGraw-Hill, Milano.
11. Grillenzoni M., Grittani G. (1994), "*Estimo*", Calderini, Bologna.
12. Guatri A., Bini M. (2005), "*Nuovo trattato sulla valutazione delle aziende*", Egea, Milano.
13. Merlo M. (1991), "*Elementi di economia ed estimo forestale-ambientale*", Patron Editore, Bologna.
14. Michieli I., Michieli M. (2004), "*Trattato di estimo*", Edagricole, Bologna.
15. Orefice M. (1996), "*Estimo Vol. III: Estimo industriale*", Utet, Torino.
16. Pavarani E. (2002), "*Sviluppo dell'impresa e fabbisogno di capitali: un modello sintetico per la pianificazione finanziaria*", in AF, n° 46, 2° trimestre 2002.
17. Pavarani E., a cura di, (2002), "*Analisi finanziaria*", McGraw-Hill, Roma.
18. Polelli M. (1997), "*Trattato di Estimo*" Maggioli, Rimini.
19. Rappaport A. (2002) "*La strategia del valore. Nuove regole della performance aziendale*", Egea, Milano.
20. Sandri S. (2000), "*Limiti applicativi del modello dell'EVA*", AF, n° 37, I° trimestre 2000, Atti del Convegno nazionale Asfim.
21. Sciarelli S. (2004) "*Fondamenti di economia e gestione delle imprese*", Cedam, Padova.
22. Shrieves R., Wachowicz M. (2000) "*Free Cash Flow (FCF) economic Value*

Added (EVA), and Net Present Value (NPV): a Reconciliation of Variations of Discounted-Cash-Flow (DCF) Valuation", Tennessee University Press, Usa.

23. Stern J.M., Shiely J.S. (2001), "*The Eva revolution*", John Wiley e Sons Inc., New York.
24. Stewart G. B. (2004), "*La ricerca del valore*", Egea, Milano.
25. Torquati B. (2003), "*Economia e gestione dell'impresa agraria*", Edagricole, Bologna.

Finito di stampare
nel mese di luglio 2007
da Toriazzi S.r.l. - Parma