

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

FEDERICO II



FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Dottorato di Ricerca in

Produzione e Sanità degli Alimenti di Origine Animale

XXII CICLO

**MANNANOLIGOSACCARIDI COME ALTERNATIVA AGLI
ANTIBIOTICI NELL'ALIMENTAZIONE
DEL CONIGLIO**

Tutor Chiar.^{mo} Prof.^{re}

Antonino Nizza

Candidato Dott.ssa

Stefania Marono

Coordinatore

Chiar.^{ma} Prof.^{ssa} Maria Luisa Cortesi

Novembre 2010

INDICE

<u>CAPITOLO 1.....</u>	<u>5</u>
<u>INTRODUZIONE GENERALE.....</u>	<u>5</u>
<u>1. ALLEVAMENTO DEL CONIGLIO.....</u>	<u>6</u>
<u>2. CENNI DI ANATOMIA E FFISIOLOGIA DELL'APPARATO DIGERENTE.....</u>	<u>9</u>
2.1. Ciecotrofia.....	10
2.2. Maturazione delle funzioni digestive.....	13
2.3 Maturazione delle funzioni immunitarie.....	16
<u>3. SVEZZAMENTO E RELATIVE PROBLEMATICHE.....</u>	<u>20</u>
3.1. Apporto di amido.....	21
3.2. Apporto di fibra.....	22
3.3. Apporto di proteine.....	23
3.4. Svezzamento precoce.....	24
<u>4. IMPIEGO DI ANTIBIOTICI NELL'ALLEVAMENTO ZOOTECNICO.....</u>	<u>25</u>
<u>5.PROBIOTICI.....</u>	<u>29</u>
<u>6. PREBIOTICI.....</u>	<u>31</u>
<u>7. ENZIMI.....</u>	<u>34</u>
<u>8. ACIDI ORGANICI.....</u>	<u>35</u>
<u>9. ESTRATTI VEGETALI.....</u>	<u>37</u>
<u>10. SCOPO DELLA TESI.....</u>	<u>39</u>
<u>11. BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>40</u>
<u>12. AZIENDA AGRICOLA MARCIANO ROSA CARMELA.....</u>	<u>61</u>
<u>CAPITOLO 2.....</u>	<u>64</u>
<u>INDAGINI PRELIMINARI SULL'IMPIEGO DEI</u>	
<u>MANNANOLIGOSACCARIDI COME ALTERNATIVA AGLI</u>	
<u>ANTIBIOTICI NELLA PRODUZIONE DEL CONIGLIO DA CARNE.</u>	<u>64</u>
<u>1. OBIETTIVO DELLA RICERCA.....</u>	<u>65</u>
<u>2. MATERIALE E METODI.....</u>	<u>66</u>
2.1. Animali e management.....	66
2.2. Diete.....	66
2.3. Rilievi effettuati nel corso delle prove.....	67
2.4. Analisi chimiche.....	68
<u>3. ANALISI STATISTICA.....</u>	<u>69</u>
<u>4. RISULTATI E DISCUSSIONI.....</u>	<u>70</u>
4.1. Periodo di accrescimento (35 – 56 giorni).....	70
4.2. Periodo di finissaggio (56 – 82 giorni).....	71
<u>5. CONCLUSIONI.....</u>	<u>75</u>

6. BIBLIOGRAFIA.....	76
<u>CAPITOLO 3.....</u>	<u>77</u>
<u>INFLUENZA DEI MANNANOLIGOSACCARIDI SULLE</u>	
<u>CARATTERISTICHE DELLE CARCASSE E SULLA QUALITA' DELLE</u>	
<u>CARNI DI CONIGLIO.....</u>	<u>77</u>
1. INTRODUZIONE.....	78
1.1. Qualità della carne.....	78
2. OBIETTIVO DELLA RICERCA.....	80
3. MATERIALE E METODI.....	81
3.1. Animali e management	81
3.2. Diete.....	81
3.3. Rilievi effettuati nel corso delle prove.....	82
3.4. Analisi chimiche	83
4. ANALISI STATISTICA.....	86
5. RISULTATI E DISCUSSIONI.....	87
6. CONCLUSIONI.....	97
7. BIBLIOGRAFIA.....	98
<u>CAPITOLO 4.....</u>	<u>101</u>
<u>EFFETTO DEI MANNANOLIGOSACCARIDI SULLE</u>	
<u>PERFORMANCE DI ACCRESCIMENTO E SULLA POPOLAZIONE</u>	
<u>BATTERICA ANAEROBICA FECALE DI CONIGLI DURANTE UN</u>	
<u>EPISODIO DI ENTEROPATIA ENZOOTICA.....</u>	<u>101</u>
1. INTRODUZIONE.....	102
2. OBIETTIVO DELLA RICERCA.....	104
3. MATERIALI E METODI.....	105
3.1. Animali e management	105
3.2. Rilievi effettuati nel corso delle prove.....	105
3.3. Diete.....	105
3.4. Procedure sperimentali	106
3.5. Analisi chimiche	107
4. ANALISI STATISTICA.....	109
5. RISULTATI.....	110
6. DISCUSSIONI.....	114
7. CONCLUSIONI.....	117
8. BIBLIOGRAFIA.....	118

<u>CAPITOLO 5.....</u>	<u>121</u>
<u>EFFETTO DEI MANNANOLIGOSACCARIDI SULL'ATTIVITA' FERMENTATIVA DELLA FLORA BATTERICA CECALE DEL CONIGLIO.....</u>	<u>121</u>
<u>1. INTRODUZIONE.....</u>	<u>122</u>
<u>2. OBIETTIVO DELLA RICERCA.....</u>	<u>123</u>
<u>3. MATERIALI E METODI.....</u>	<u>124</u>
3.1. Animali e management	124
3.2. Diete.....	124
3.3. Produzione cumulativa di gas in vitro.....	125
<u>4. CALCOLI STECHIOMETRICI.....</u>	<u>127</u>
<u>5. ANALISI STATISTICA.....</u>	<u>128</u>
<u>6. RISULTATI.....</u>	<u>129</u>
<u>7. DISCUSSIONI.....</u>	<u>134</u>
<u>8. CONCLUSIONI.....</u>	<u>139</u>
<u>9. BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>140</u>
<u>CAPITOLO 6.....</u>	<u>144</u>
<u>EFFETTO DELL'UTILIZZO DI MANNANOLIGOSACCARIDI SULLE PERFORMANCE IN VIVO, SULLA DIGERIBILITA' DEI NUTRIENTI E SULLE CARATTERISTICHE DEL CONTENUTO CECALE DI CONIGLI IN FASE DI ACCRESCIMENTO.....</u>	<u>144</u>
<u>1. OBIETTIVO DELLA RICERCA.....</u>	<u>145</u>
<u>2.MATERIALI E METODI.....</u>	<u>146</u>
2.1. Animali e management	146
2.2. Diete.....	146
2.3. Rilievi ponderali e procedure sperimentali.....	146
2.4. Analisi chimiche.....	148
<u>3. ANALISI STATISTICA.....</u>	<u>149</u>
<u>4. RISULTATI.....</u>	<u>150</u>
<u>5. DISCUSSIONI.....</u>	<u>153</u>
<u>6. CONCLUSIONI.....</u>	<u>156</u>
<u>7.BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>157</u>
<u>CAPITOLO 7.....</u>	<u>159</u>
<u>CONCLUSIONI GENERALI.....</u>	<u>159</u>
<u>1.CONCLUSIONI GENERALI.....</u>	<u>160</u>

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE GENERALE

1. ALLEVAMENTO DEL CONIGLIO

Da sempre presente nell'organizzazione produttiva e sociale delle nostre aziende agricole come realtà marginale deputata all'allevamento di animali destinati all'autoconsumo, la conigliicoltura ha perso negli ultimi decenni i caratteri di ruralità che l'hanno a lungo contraddistinta, assumendo quelli propri di un'attività zootecnica intensiva e razionale.

Attualmente l'Italia è al terzo posto a livello mondiale dopo la Cina ed il Venezuela (Tabella 1) per la produzione di carne di coniglio e detiene il primato europeo con il 40% della produzione comunitaria, che in termini quantitativi risulta essere pari a 240.000 t di carne macellata (dati FAO), e un'esportazione pari a 4.200 t (Maniero, 2008), seguita da Spagna, Corea ed Egitto (tabella 1), con un grado di auto approvvigionamento che supera il 90%, stimato addirittura dagli ultimi dati della FAO (2008) pari al 99 %.

Tabella 1. Produzione di carne cunicola nel mondo (FAO, 2008)

Paese	Tonnellate
Cina	660000
Venezuela	244000
Italia	240000
Spagna	68686
Corea	91.000
Egitto	69.840
Francia	51.400
Repubblica Ceca	38500
Germania	33.600
Resto del mondo	99.568
Totale	1.596.594

L'allevamento del coniglio quindi, nel nostro Paese assume una posizione di rilievo, rappresenta infatti il 9% della Produzione Lorda Vendibile dell'intero comparto zootecnico da

carne, ponendo la carne di coniglio al quarto posto dopo la produzione di carne bovina, suina ed avicola (Tabella 2).

Tabella 2. Statistiche zootecnia italiana da carne nel 2003 (ASSALZOO, 2004; FAOSTAT 2007).

	Produzione (t)	Consumo Individuale (kg/pro-capite)	Livello di Auto approvvigionamento (%)
Carni bovine	1.128.220	23	63
Carni suine	1.588.660	31	67
Carni avicole	1.134.000	18	106
Carni cunicole	222.000	4	99

Attualmente è da considerare che parte della produzione sfugge ad una precisa rilevazione statistica, in quanto viene esclusa una serie di aziende che allevano un numero limitato di capi come attività secondaria, o part-time, prevalentemente destinati all'auto-consumo.

La carne di coniglio viene considerata la prima fra le carni "alternative", a sottolineare da un lato la sua importanza, e dall'altro il fatto di costituire un piatto non comune e abitudinario come quelli forniti dalle altre carni (Bittante *et al.* 1993; Dalle Zotte, 2002).

Le carni di coniglio, come quelle avicole, sono definite "carni bianche" e sono caratterizzate da un basso contenuto di lipidi, colesterolo e sodio, da un buon apporto di proteine e dall'assenza di fattori allergenici o antinutrizionali (Parigi Bini *et al.*, 1992; dalle Zotte, 2002) tanto è vero che sono carni particolarmente consigliate nell'alimentazione dei bambini.

Attualmente, la maggior parte delle aziende che praticano cunicoltura come attività primaria si trova nell'Italia settentrionale e precisamente in Veneto, Lombardia, Piemonte, Emilia Romagna. Il Veneto da solo ha una produzione pari a 80.000 t/anno che rappresenta il 38% della produzione nazionale (Coniglio Veneto, 2002).

La stima dei consumi domestici di carne di coniglio si aggira attorno a 4,0 kg/procapite annui (FAO, 2007). Un caso a se è rappresentato però dalla Campania che è la prima e più importante realtà del Sud Italia ed è la regione dove si consuma più carne di coniglio con un consumo procapite nettamente superiore alla media nazionale (16 kg/procapite), con punte massime sull'isola d'Ischia, dove il consumo arriva a ben quaranta chilogrammi annui. Un dato influenzato dalla notevole affluenza di turisti, e comunque legato ad una forte tradizione locale.

Il peso vivo di vendita oscilla fra i 2,2 e i 3,0 kg a seconda delle regioni, con valori medi che si aggirano sui 2,5 kg. Il peso della carcassa, in media 1,6 kg, è più elevato che negli altri 10 Paesi europei dove il coniglio è allevato, imponendo cicli d'allevamento più lunghi, pari a 75-85 giorni, contro i 65-70 giorni di Francia e Spagna dove il consumatore preferisce carcasse più leggere.

Gli allevamenti industriali sono generalmente organizzati a ciclo chiuso, in quanto coesistono il settore della riproduzione e quello dell'ingrasso (spesso in locali separati).

La gestione aziendale della produzione è controllata con la ciclizzazione delle fattrici e l'impiego dell'inseminazione artificiale.

La coniglicoltura italiana è caratterizzata da un basso livello di integrazione con il settore mangimistico; circa il 30% degli allevatori risulta legato ad associazioni mentre la quota rimanente è totalmente indipendente ed autonoma. Il settore della distribuzione risulta ripartito tra la grande distribuzione organizzata che acquista direttamente dal grande macellatore (65% del mercato) e macellerie tradizionali che acquistano tramite il grossista (35% del mercato) (Xiccato e Trocino, 2007).

2. CENNI DI ANATOMIA E FFISIOLOGIA DELL'APPARATO DIGERENTE

L'apparato digerente del coniglio è costituito, come si può osservare nella Figura 1, da: bocca, esofago, stomaco e intestino (diviso in tenue, crasso e retto).

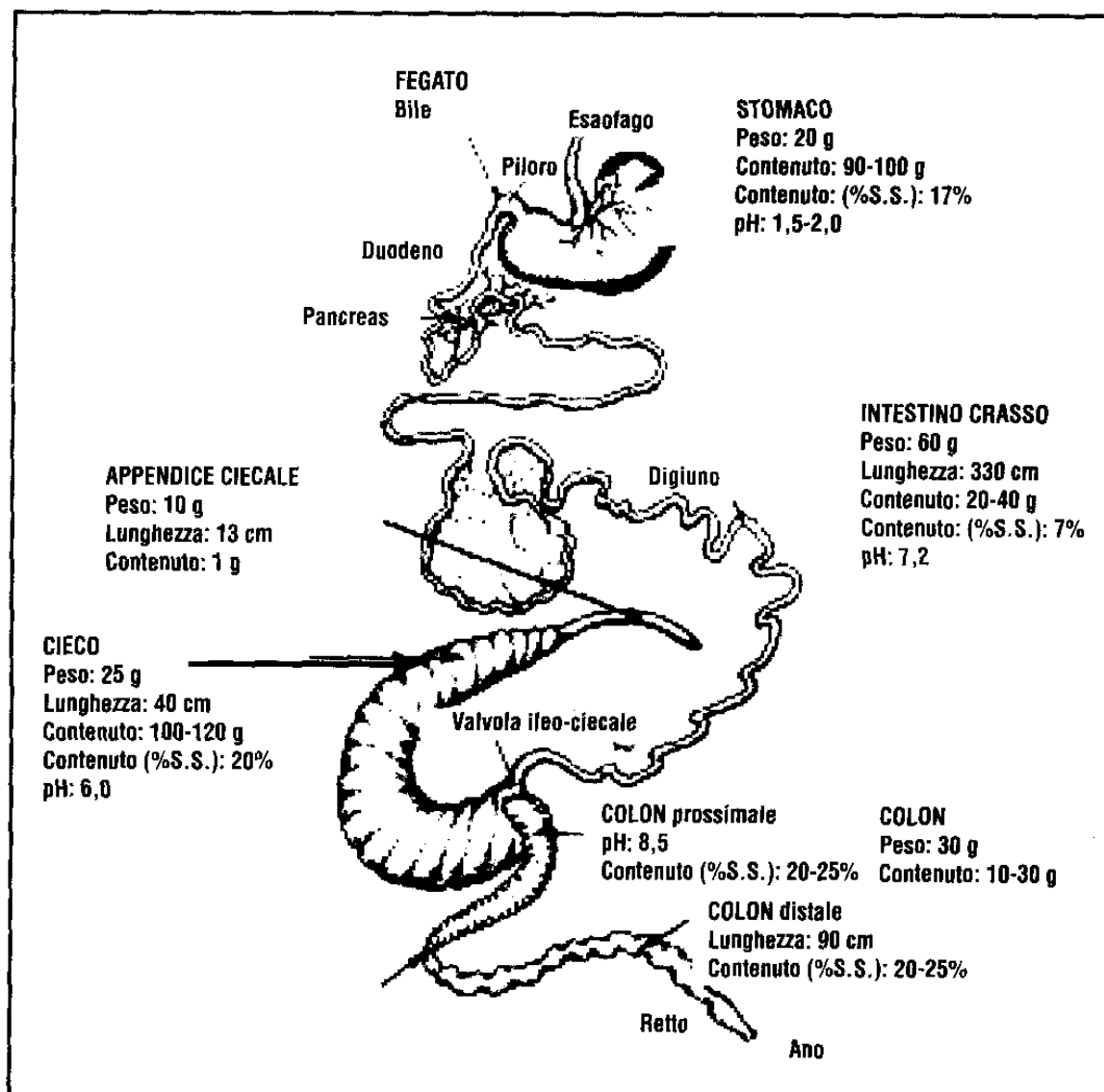


Figura 1 – Apparato digerente del coniglio adulto (Lebas et al., 1997)

Il primo importante compartimento dell'apparato digerente del coniglio è lo stomaco, il quale è rivestito da un sottile strato muscolare ed è sempre quasi pieno.

Il range di pH in questo organo, varia da 1 fino ad arrivare a 6, a seconda del sito di determinazione (regione del fondo, o regione del cardias) (Gutiérrez *et al.*, 2002, 2003,

Chamorro *et al.*, 2007; Orengo e Gidenne, 2007; Gómez-Conde *et al.*, 2009), della presenza o meno delle feci morbide (Griffiths e Davie, 1963), della distanza dall'ingestione di alimenti (Alexander e Chowdhury, 1958) e dall'età del coniglio (Grobner, 1982).

Il pH gastrico nei lattanti è piuttosto elevato (circa 6) e si mantiene relativamente costante durante i primi 21 giorni di lattazione dopo di che inizia l'ingestione di alimento solido e ciecotrofo, e il pH tende a scendere (Zomborsky-Kovács *et al.*, 2000).

I più bassi valori di pH si riscontrano nella regione del cardias, in assenza di ciecotrofo, dopo circa 4 ore dall'ingestione di alimento in conigli di 3 settimane di età in presenza di piccole quantità di latte (Orengo e Gidenne, 2007).

Allo stomaco segue il piccolo intestino in cui si riscontra un funzionamento simile a quello di altri monogastrici, il pH si aggira intorno a 7.2 - 7.5 nella parte superiore e si abbassa a 6.2 - 6.5 nella parte ileale (Vernary e Raynaud, 1975; Nicodemus *et al.*, 2002). In questo sito hanno luogo la maggior parte dei fenomeni di digestione e di assorbimento in seguito a meccanismi di trasporto attivo o passivo attraverso la mucosa.

Tutto ciò che non viene assorbito nell'intestino tenue, passa la valvola ileo-cieco-colica e raggiunge il cieco. Quest'ultimo è costituito da un sottile strato muscolare e da tessuto linfoide e mostra una serie di pieghe che hanno il compito di aumentare la superficie di contatto con le sostanze alimentari, raggiunge una lunghezza di circa 45 cm nel coniglio adulto, con un diametro maggiore rispetto agli altri tratti intestinali (circa 3 - 4 cm). Il contenuto cecale (100 - 120 g), ha una sostanza secca pari a 21 - 24% (Fortun-Lamothe e Gidenne, 2006), e un pH leggermente acido (pH 5.4 - 6.8) (Garcia *et al.*, 2002). Il cieco ha una capacità pari a circa il 49% della capacità totale dell'apparato digerente (Portsmouth, 1977).

Al cieco seguono il colon, diviso in prossimale (circa 35 cm di lunghezza) e distale (80-100cm) ed il retto.

Al digerente sono inoltre annessi altri tipi di tessuti, come quello linfoide e cellule specializzate, che regolano l'interazione tra la mucosa intestinale, la popolazione microbica e lo sviluppo di meccanismi di tolleranza, e protezione contro gli agenti patogeni (Carabano *et al.*, 1998).

2.1. Ciecotrofia

Le dimensioni del cieco, sono giustificate dal fatto che il coniglio possiede una ricca popolazione microbica intestinale che svolge un'azione simile a quella che si realizza nei

ruminanti, con la differenza che in questi ultimi le fermentazioni avvengono all'inizio del tratto digerente (a livello ruminale) mentre nei conigli si realizzano alla fine di quest'ultimo (a livello ciecale) come avviene anche nel cavallo, per cui i prodotti derivanti dalle sintesi batteriche possono essere solo in parte utilizzati.

A differenza del cavallo, nel coniglio si assiste ad una particolarità fisiologica interessante, la ciecotrofia, che consente una più efficiente utilizzazione dei prodotti delle sintesi microbiche nonostante le fermentazioni avvengano a valle del digerente.

La ciecotrofia è un meccanismo per il quale il coniglio elimina durante la giornata due differenti tipi di escreti: le feci dure e il ciecotrofo (o feci molli). La produzione di ciecotrofo avviene principalmente durante le ore di luce mentre l'ingestione di alimento e l'escrezione di feci dure avvengono durante le ore di buio (Lebas e Laplace, 1974, 1975; Fioramonti e Ruckebush, 1976; Ruckebush e Hörnicke, 1977; Battaglini e Grandi, 1988; Merino, 1994; Bellier *et al.*, 1995; Bellier e Gidenne, 1996; El-Adawy, 1996, Orengo e Gidenne, 2007) (Figura 2).

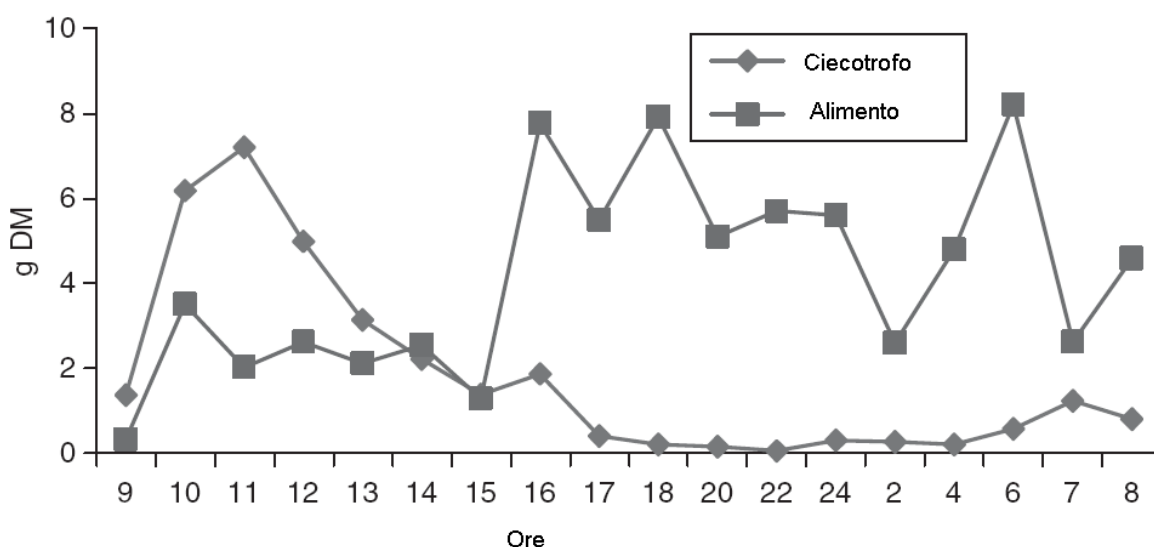


Figura 2 – Escrezione delle feci dure e molli e ingestione della sostanza secca durante il giorno (Carabaño e Merino, 1996)

Non si conoscono bene i fattori che regolano la produzione dei due tipi di feci, comunque sembra accertato che la luce e l'alimentazione abbiano un ruolo predominante, ma anche l'età, lo stato fisiologico e le modalità di somministrazione dell'alimento (razionato o *ad libitum*).

La ciecotrofia ha inizio a 3 - 4 settimane di età (Orengo e Gidenne, 2007), quando il coniglietto comincia a consumare alimento solido. Nei conigli in fase di post svezzamento (4

Insieme alle spoglie batteriche, questo materiale va a costituire le feci molli, o ciecotrofo, formate da una sequenza di sfere dalla consistenza pastosa (diametro 4 - 5 mm) rivestite da un film mucoso di colore verdognolo e con un odore molto forte e caratteristico, dovuto alle grandi quantità di acido acetico, butirrico e propionico presenti. Esiste quindi una grande differenza tra la composizione chimica delle feci morbide e quelle dure (Tabella 4).

Tabella 4 – Composizione chimica di contenuto cecale, ciecotrofo e feci (valori medi espressi in % sulla sostanza secca).

	CONTENUTO CECALE	CIECOTROFO	FECI
Umidità	77.9	71.2	41.3
Protidi Grezzi	24	28.7	11.7
Estratto Etereo	2.4	2.1	2.3
Fibra Grezza	24.2	22.2	35
Estrattivi Inazotati	37.3	35.9	39.7
Ceneri	12.1	11.1	9.3

Le feci molli vengono prelevate direttamente dall'ano e ingerite dopo un'abbondante insalivazione (Gidenne e Poncet, 1985).

La doppia protezione costituita dal muco colico e dalla saliva e la rallentata motilità dello stomaco, permette al ciecotrofo, dopo l'ingestione, di arrivare intatto all'intestino tenue, senza subire l'attacco acido ed enzimatico dei succhi gastrici, così da permettere il recupero delle proteine microbiche, nonché l'utilizzazione dell'azoto ammoniacale e l'assorbimento di sali minerali, acqua e vitamine del complesso B, di cui il ciecotrofo è ricco.

Le proteine contenute nel ciecotrofo sono ricche di amminoacidi essenziali come lisina, cisteina, metionina e treonina (Proto, 1976; Spreadbury, 1978; Nicodemus *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2004).

La formazione delle feci dure, invece, avviene nel colon nel quale, la parte fibrosa non digerita attraverso movimenti peristaltici, arriva al colon distale dove le particelle più grossolane (superiori ai 3 mm di lunghezza) ricche di fibra indigeribile subiscono un ulteriore riassorbimento di acqua (Cheeke, 1987; Castrovilli e Greppi, 1990).

2.2. Maturazione delle funzioni digestive

L'apparato digerente ha una doppia funzione, quella deputata alla digestione dei nutrienti e quella deputata alla protezione contro microrganismi indesiderati. Queste funzioni si

sviluppano gradualmente a partire dalla vita fetale, fino al raggiungimento della completa maturità alle 11 settimane di vita.

Lo sviluppo del digerente è influenzato da fattori ontogenici quali età, accrescimento dell'individuo, dieta e interazione con la microflora intestinale (Fortun-Lamothe e Gidenne, 2006), e segue un gradiente cranio-caudale (Fortun-Lamothe e Gidenne, 2006, Carabano *et al*, 1998). Alla nascita, lo stomaco ed il piccolo intestino sono i tratti maggiormente sviluppati (Figura 4) e assicurano la sopravvivenza del nuovo nato (Carabano *et al*, 1998). Infatti, dalla nascita fino a 18 - 20 giorni di età i coniglietti si nutrono di solo latte che viene assunto dalla madre una sola volta al giorno in grande quantità (da un giorno a tre settimane di età l'ingestione di latte aumenta da 10 fino ad arrivare a 30 g/die).

Intorno ai 18 giorni di età, i coniglietti cominciano a consumare anche alimenti solidi mentre l'assunzione del latte man mano decresce.

In questo periodo il cieco ed il colon si sviluppano più velocemente rispetto agli altri tratti (Figura 4), rappresentando il 28% dell'intero tratto digerente a 3 settimane di età ed il 44% ad 11 (Lebas e Laplace, 1972; Alus e Edwards, 1977; Xiccato *et al*, 2001).

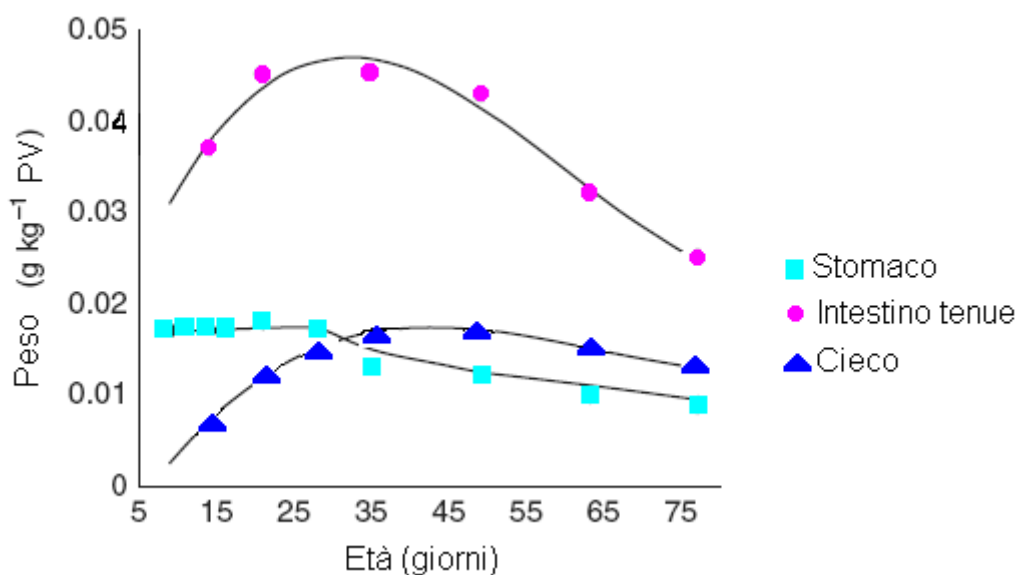


Figura 4: Peso relativo di ciascun tratto del digerente vuoto rispetto al peso corporeo (Le base e Laplace, 1972; Garcia Rebollar *et al.*, 2004; Galloise *et al.*, 2005).

Inoltre, dalla terza alla settima settimana di vita, il cieco comincia a riempirsi, fino a raggiungere il picco massimo tra la settima e la nona settimana di età. Il suo accrescimento si completa ad 11 settimane di vita.

La mucosa intestinale (costituita da: epitelio, tessuto linfoide e cellule Globet) (Figura 5), subisce delle profonde modificazioni morfologiche durante le settimane che seguono la nascita e la sua maturazione istologica si ha non prima del ventesimo giorno di età (Toofanian e Targowsky, 1982).

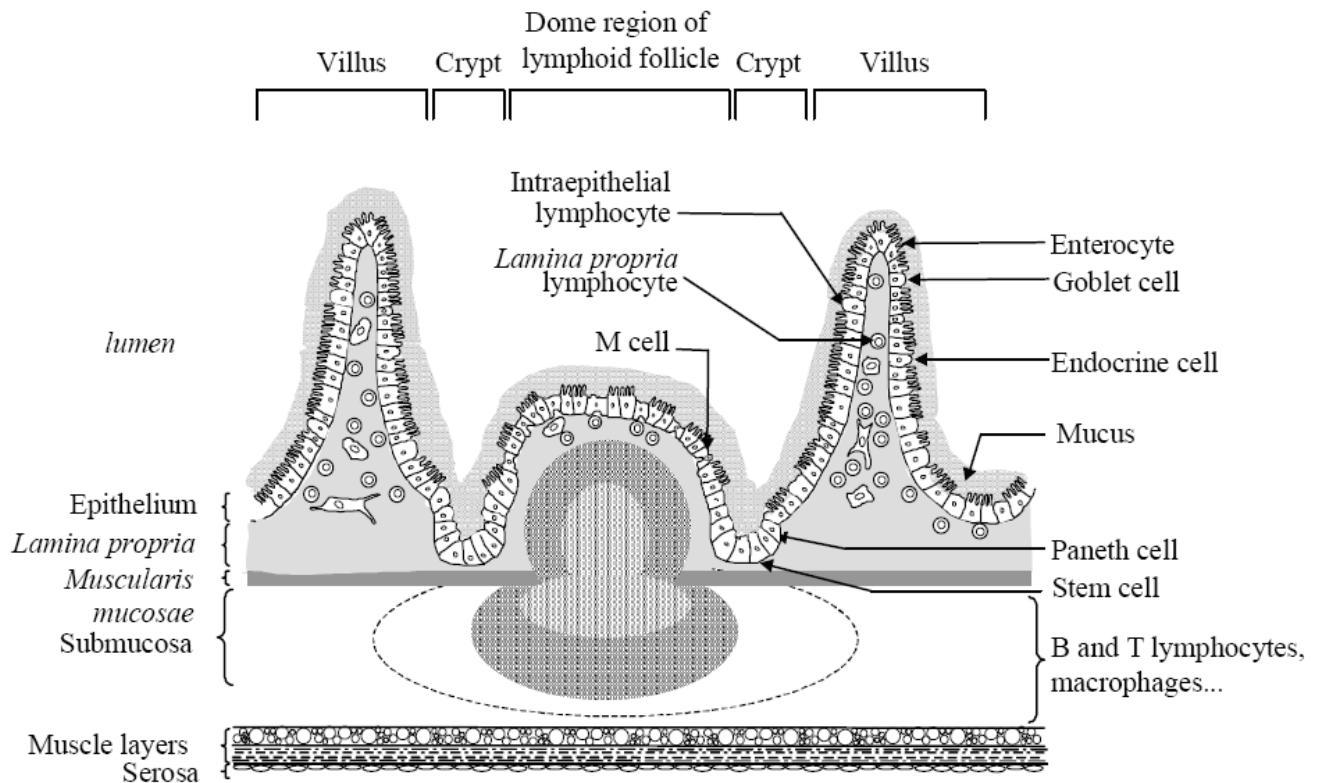


Figura 5: Organizzazione della mucosa digestiva del coniglio comprensiva dell'epitelio (enterociti, cellule Globet e paneth cells) e del tessuto linfoide associato (follicoli linfoidi e cellule diffuse nella lamina propria o nell'epitelio).

Le ghiandole che rivestono le pareti dello stomaco sono già evidenti in feti a 26 giorni di gestazione, mentre la comparsa dei villi intestinali e delle cripte di Lieberkuhn, si osserva al 29° giorno di gestazione. Nelle prime settimane di vita i villi intestinali, che sono sottili e di forma allungata, cominciano ad ispessirsi a tal punto che il rapporto altezza/larghezza si aggira intorno a 2.2 - 2.4 (Yu e Chiou, 1997; Van der Hage, 1998; Sabatakou *et al.*, 1999).

Le cellule secernenti muco del cieco e del colon cambiano il loro aspetto a partire dal 16° giorno di età, quando inizia l'interazione con la flora intestinale e l'attività fermentativa da essa svolta (Yu e Chou, 1997; Sabatakou *et al.*, 1999 a, b).

Durante il periodo in cui i conigli si nutrono esclusivamente di latte, le ghiandole presenti sulla mucosa del digerente, producono enzimi in grado di digerire la maggior parte delle

sostanze contenute nel latte, mentre la funzionalità e la maturità del pancreas non è ancora paragonabile a quella di un coniglio adulto.

Il pancreas infatti, aumenta notevolmente di peso e volume quando l'animale comincia ad introdurre nella sua dieta alimenti solidi (Lebas *et al.*, 1971). In questo periodo perciò, le lipasi gastriche effettuano la maggior parte dell'attività lipolitica che si attua nell'intero digerente (Marounek *et al.*, 1995). L'attività lattasica è quella maggiormente presente fino ai 25 giorni di età, quando l'attività di enzimi quali, saccarasi e maltasi, cresce fino a raggiungere il livello che si osserva in un coniglio adulto intorno ai 28 - 32 giorni di età (Gutiérrez *et al.*, 2002; García Rebollar *et al.*, 2004; Gallois *et al.*, 2008b).

L'attività proteolitica è anche essa localizzata a livello gastrico nel giovane coniglio fino ai 60 giorni di età ed è rappresentata da enzimi quali: rennina alla nascita (Henschel *et al.*, 1972) e pepsina da 2 a 5 settimane di età (Bernadac *et al.*, 1991 Dojana *et al.*, 1998); tale attività decresce al crescere di quella che si sviluppa a livello di cieco, colon e pancreas (Marounek *et al.*, 1995).

La digestione dei nutrienti, dai 21 ai 42 giorni di età, risulta essere quindi limitata dalla mancanza di enzimi come lipasi ed amilasi prodotti a livello pancreatico, nonché da enzimi gastrici, intestinali, e quelli prodotti dalla flora microbica intestinale (ad es: cellulasi, xilanasi, ureasi ecc), che consentono la digestione di alcuni tipi di fibra.

I microrganismi che abitano il cieco, danno come prodotto finale delle loro fermentazioni, acidi grassi volatili, ammoniaca, anidride carbonica, metano ed idrogeno.

L'attività fibrolitica nel cieco non compare prima delle due settimane di età (Padhila *et al.*, 1995; Pinheiro *et al.*, 2001) e di conseguenza la produzione di AGV aumenta con l'aumentare dell'età dei giovani conigli e si assiste anche ad una variazione nelle quantità dei vari acidi grassi volatili (in particolare acetico, propionico e butirrico) sintetizzati (Bellier *et al.*, 1995). Al contrario, la concentrazione di ammoniaca nel cieco, diminuisce leggermente (Gidenne e Fortune-Lamothe, 2002).

Questa situazione induce quindi, dai 15 ai 42 giorni di età, una caduta del pH a livello cecale (Fortune-Lamothe e Gidenne, 2006).

2.3 Maturazione delle funzioni immunitarie

Il sistema immunitario associato alla mucosa, costituito da tessuto linfoide (Gut associated

lymphoid tissue, GALT), è responsabile della protezione della mucosa nei confronti dei patogeni e regola la risposta infiammatoria.

Il sistema immunitario intestinale è particolarmente complicato in quanto non solo è responsabile della difesa nei confronti di agenti infettivi, ma deve anche essere capace di distinguere gli antigeni della dieta e la flora fisiologicamente presente nell'intestino e sviluppare un efficace meccanismo di tolleranza nei confronti di questi per evitare l'insorgenza di allergie a certi alimenti o risposte infiammatorie. La risposta di tolleranza è prioritaria rispetto a quella di difesa ed è quella che assicura la sopravvivenza dell'animale.

Il primo effetto barriera contro i patogeni è però rappresentato dal muco che riveste l'epitelio e che viene prodotto dalle cellule Goblet, la cui funzione è quella di protezione dai danni di tipo meccanico, chimico o enzimatico e relativi all'adesione dei batteri.

Una volta oltrepassato questo film mucoso, i patogeni giungono a contatto con la mucosa dove incontrano il tessuto linfoide dell'intestino. Quest'ultimo si distribuisce in due forme distinte (Carabano *et al.*, 2008):

- forma organizzata: follicoli linfoidei, distribuiti nelle cosiddette placche del Peyer, l'appendice ciecale, riscontrata solo in questa specie (Mage, 1998), e il sacculus rotundus;
- forma diffusa: sia nella lamina propria (linfociti della lamina propria) che nelle cellule epiteliali della mucosa intestinale (linfociti intraepiteliali).

Il tessuto linfoide organizzato contiene numerosi follicoli che sono i centri principali nei quali si avvia la risposta immunitaria intestinale.

La lamina propria (LP) è il sito di maggiore produzione di anticorpi di tutta la mucosa. L'immunoglobulina più importante sintetizzata nell'intestino è la IgA, la cui funzione principale è quella di mantenere l'integrità della mucosa rispetto a possibili infezioni e agenti tossici. Altra immunoglobulina importante a livello intestinale è la IgE, che viene solitamente sintetizzata in situazioni di reazioni allergiche.

Nella LP sono presenti anche linfociti T, prevalentemente con attività ausiliaria (T helper, Th). I linfociti intraepiteliali sono la prima linea di difesa nei confronti di infezioni della mucosa e sono costituiti per la maggior parte da linfociti ad attività citotossica (linfociti Tc).

La risposta immunitaria della mucosa intestinale può essere così schematizzata. In seguito al riconoscimento di un antigene, macrofagi e cellule dendritiche si incaricano di modificare determinate componenti proteiche dello stesso e trasportarle ai linfociti T helper (Th o CD4+).

I linfociti Th si occupano della modulazione della risposta, secernendo citochine (proteine solubili) che attiveranno la risposta umorale (complesso di citochine Th2) o una risposta cellulare (complesso di citochine Th1). La risposta umorale, mediata dal complesso di

citochine Th2, attiva i linfociti B trasformandoli in plasmacellule secernenti le immunoglobuline (IgA, IgM, IgG) contro antigeni specifici, le quali porteranno ad una risposta di tolleranza. La risposta cellulare, mediata dal complesso di citochine Th1, dà luogo invece all'attivazione dei linfociti T citotossici (Tc o CD8+) e alla morte della cellula che porta l'antigene.

Inoltre, i linfociti citotossici possono essere attivati direttamente attraverso cellule della mucosa (enterociti) mediante il complesso di immuno-isto-compatibilità di classe I (MHC-I). Questa risposta è possibile quando si producono danni o aggressioni alla mucosa che facilitano la penetrazione della stessa da parte di batteri, virus o tossine.

L'equilibrio della risposta di tolleranza (risposta umorale, Th2) o aggressività (risposta cellulare, Th1) del sistema immunitario non è stato completamente studiato, ma sembra che i batteri saprofiti, soprattutto alcuni generi, possano influenzare la risposta immunitaria della mucosa verso l'attivazione della via Th2 (Kelly *et al.*, 2005).

Lo sviluppo del sistema immunitario, ed in particolare delle cellule B, nel coniglio può essere diviso in tre momenti (Knight e Crane, 1994):

- il primo stadio, fetale e neonatale, consiste in una linfopoiesi che creerà il corredo linfocitario neonatale e si svolge principalmente nel fegato e nel midollo osseo.
- il secondo stadio, consiste nella creazione di un repertorio primario di anticorpi tra la 3^a e 8^a settimana di vita dell'animale, mediante la proliferazione e diversificazione dei linfociti del GALT.
- il terzo stadio che corrisponde alla formazione di un secondo corredo di anticorpi nell'età adulta degli animali, che riguarderebbe principalmente la proliferazione di cellule B in organi linfoidi secondari.

Il corredo che si crea nel feto dipende da fattori genetici e dall'interazione con il sistema immunitario materno. Diversamente, lo sviluppo del corredo primario dipende fondamentalmente dalla popolazione microbica intestinale. Diverse review bibliografiche riferite sia al coniglio (Knight e Windstead, 1997, Lanning *et al.*, 2000;) che all'uomo (Kelly *et al.*, 2005) hanno indicato che la presenza della flora che normalmente risiede nell'intestino, e probabilmente di alcuni generi in particolare, può essere cruciale per lo sviluppo del corredo primario di anticorpi.

L'insediamento della flora intestinale nel coniglio si realizza già durante la lattazione proprio durante lo sviluppo del GALT (Lanning *et al.*, 2000a; Vajdy *et al.*, 1998), ma solo con il consumo di mangime inizia a svilupparsi l'attività fermentativa tipica di quest'ultima. In accordo con Lebas e Laplace (1972), il peso del contenuto ciecale (espresso in rapporto al

peso vivo dell'animale) si duplica fra la terza e la quinta settimana di vita e tale proporzione elevata si mantiene fino alla settima settimana. Tra la terza e la sesta settimana di vita, l'area follicolare nell'appendice ciecale aumenta, mantenendo poi la stessa proporzione fino all'età adulta (Dasso *et al.*, 2000). Anche la zona proliferativa dei follicoli raggiunge il suo massimo sviluppo alla 6° settimane di vita.

Tra i 19 e i 26 giorni di età si realizza sia un aumento della proporzione dei linfociti totali rispetto al numero di cellule della LP che un aumento della percentuale dei linfociti B rispetto ai linfociti T (Campín *et al.*, 2003).

Differenti indicatori immunitari suggeriscono che il sistema immunitario, prima delle otto settimane di età, non corrisponde ancora a quello di un animale adulto.

3. SVEZZAMENTO E RELATIVE PROBLEMATICHE

Durante la fase di svezzamento (28 - 35giorni di età) i conigli vengono sottoposti a forti stress di tipo individuale, ambientale ed alimentare.

In questo periodo infatti, il coniglio passa da un'alimentazione esclusivamente lattea (ricca in proteine animali e grassi e povera di carboidrati), prima ad una di tipo misto (latte-mangime) in cui il mangime è lo stesso che riceve la fattrice (che quindi non corrisponde ai suoi fabbisogni), e poi ad una esclusivamente solida (ricca di proteine vegetali e carboidrati) subendo contemporaneamente il distacco dalla madre, nonché il cambio di gabbia e di gruppo sociale.

Conseguentemente all'interruzione dell'ingestione di latte, si ha una diminuzione dell'ingestione di immunoglobuline del latte e un ridotto consumo di alcuni nutrienti (Gallois *et al.*, 2005) che possono risultare insufficienti alla copertura dei fabbisogni dell'animale, sia per la crescita che per lo sviluppo dell'intestino e delle sue capacità digestive e immunitarie.

Questi innumerevoli cambiamenti inoltre, avvengono in un momento in cui, come descritto nei paragrafi precedenti, sia il digerente, che il GULT risultano essere ancora non completamente maturi.

La risposta dell'animale a tutte queste variazioni è spesso insufficiente ed ha di frequente come conseguenza l'insorgenza di patologie enteriche ad eziologia multifattoriale, che in condizioni di allevamento intensivo possono determinare elevata morbilità e mortalità che si traducono in una sensibile riduzione della redditività aziendale.

Attualmente le principali patologie enteriche, responsabili della quasi totalità delle perdite all'interno di un allevamento cunicolo, vengono classificate come segue (Peters, 1992):

1. enteriti multifattoriali: causate da agenti moderatamente patogeni (alcuni ceppi di *Escherichia coli* e *Bacillus piliformi*), che causano una mortalità del 5-20%.
2. enteriti specifiche: dovute ad agenti molto patogeni, indipendenti da fattori ambientali o alimentari predisponenti (ceppi di *E. coli* enteropatogeni, *Eimeria piriformis*, *Eimeria intestinalis*, *Eimeria flavescens*). Hanno comparsa improvvisa e causano oltre il 30% di mortalità.
3. enterotossiemia-iota: indotta dalla proliferazione di *Clostridium spiroforme* in conseguenza a dismicrobiosi ciecali di diversa eziologia.
4. enteriti sub-cliniche: decorrenti con peggioramento dell'indice di conversione e saltuariamente con manifestazioni diarroiche.

Tra i fattori stressogeni menzionati che possono portare all'insorgenza di disturbi enterici, il cambio di alimentazione sembra essere il maggior responsabile. In particolare, nella comparsa dei disturbi digestivi sono imputati, il livello ed il tipo di fibra (De Blas *et al.*, 1999b; Gidenne, 2000) ed il livello di proteina (Carabaño *et al.*, 2002).

E' stato osservato (Gutiérrez *et al.*, 2002) che il cambio di alimentazione a livello del tenue produce un peggioramento delle caratteristiche della barriera intestinale legate ad un cambio della struttura della mucosa, nonché della sua funzionalità che facilitano la traslocazione dei batteri .

Inoltre, l'arrivo nella porzione terminale dell'ileo, di una maggiore quantità di substrato ingerito, fa sì che da un lato venga richiamata acqua nel cieco-colon, con conseguenti diarree, dall'altro si crei una situazione favorevole per i batteri cecali, che utilizzano tali substrati per le proprie fermentazioni.

I prodotti finali di tali fermentazioni, si accumulano determinando forti variazioni di pH a livello intestinale, che a loro volta possono favorire la proliferazioni di batteri patogeni.

L'apporto di amido, nonché il livello ed il tipo di fibra, nelle diete sembra essere determinante nell'insorgenza di tali disturbi.

3.1. Apporto di amido

Nell'alimentazione del coniglio, l'amido rappresenta la fonte energetica per eccellenza in quanto altamente digeribile; il suo impiego è tuttavia condizionato dalla possibile insorgenza di disturbi digestivi, soprattutto quando si tratta di animali giovani (Gidenne, 1996). La digeribilità dell'amido varia, infatti, in base allo stato fisiologico dell'animale ed alle fonti. Gli animali giovani non digeriscono appieno questo polisaccaride, in quanto mancano del giusto corredo enzimatico (amilasi) che sarà pressoché completo intorno alle 5 - 6 settimane di età.

In quanto alla fonte, l'amido delle cariossidi di mais è molto meno digeribile di quello contenuto nell'orzo (Blas *et al.*, 1990).

Esiste un'ampia bibliografia relativa all'effetto del livello di amido sulle prestazioni produttive in giovani conigli rapportate al loro stato di salute (Blas e Gidenne, 1998). Nei conigli più giovani nel post-svezzamento si consiglia un apporto di amido inferiore all'8% (Gidenne e Fortun-Lamothe, 2002) per il rischio di un eccessivo flusso di amido a livello ciecale.

Gidenne *et al.* (2006) hanno osservato in conigli in fase di svezzamento (28-35 d), un maggior impatto della fibra rispetto all'amido sullo stato di salute a livello ciecale.

Allo stato attuale delle conoscenze, si può comunque affermare che il contenuto ottimale di amido in diete per conigli in svezzamento va dal 10 al 13% (Maertens, 1992; Gidenne e Fortun-Lamothe, 2002), arrivando a valori di amido del 17-20% per le fasi successive di ingrasso e per i riproduttori (Maertens, 1992; Xiccato, 1993).

3.2. Apporto di fibra

L'effetto benefico della fibra sulla fisiologia digestiva del coniglio è stato largamente dimostrato nella bibliografia internazionale (Lebas, 1989; Blas e Gidenne, 1998; De Blas e Mateos, 1998). L'apporto minimo consigliato è del 5 % di fibra indigeribile (ADL) (Gidenne, 2003). Al di sotto di tale valore si può verificare un drastico rallentamento della motilità ciecale con conseguente possibilità da parte della microflora di intaccare la frazione proteica della dieta causando un innalzamento del livello di azoto ammoniacale e quindi del pH che favorisce lo sviluppo della componente microbica patogena (Gidenne, 1996; Bennegadi *et al.*, 2000).

D'altra parte un apporto eccessivo di fibra induce un aumento della velocità di transito con diminuzione della digeribilità della dieta e quindi peggioramento dell'indice di conversione.

In animali svezzati a 25 giorni e alimentati con diete al 25, 30 e 35 % di NDF, Nicodemus *et al.* (2004) hanno osservato una diminuzione della mortalità per enteropatia enzootica soprattutto utilizzando diete con apporto intermedio di fibra.

Si è osservato inoltre, che quando si è passati da diete con un contenuto di NDF del 36 % a diete in cui l'NDF era pari al 30 %, la mortalità si riduceva, miglioravano le prestazioni produttive in seguito ad una migliore utilizzazione dei nutrienti, e la mucosa non subiva variazioni nella sua struttura (Gutiérrez *et al.*, 2002), per cui livelli superiori di fibra risultano superare la capacità fermentativa del cieco relativa all'età e favorire la crescita di patogeni.

Alcuni autori (Chiou *et al.*, 1994, García *et al.*, 1997) hanno riportato che l'inclusione nella dieta di fibre solubili (pectine) ha favorito la crescita dei villi intestinali e l'attività degli enterociti con conseguente riduzione della comparsa di *C. perfringens* nel cieco e di patogeni opportunisti come *Campilobacter* sia nell'ileo che nel cieco, mentre l'inclusione di fibre lignificate ha prodotto un'atrofia strutturale e una minore attività delle cellule intestinali. I risultati ottenuti con diete da svezzamento hanno evidenziato quindi, che il livello di fibra

solubile può giocare un ruolo importante anche nella riduzione della comparsa di EEC, e che le migliori risposte a riguardo si sono ottenute con livelli di fibra solubile nel mangime pari al 10 - 12%.

3.3. Apporto di proteine

Per quanto riguarda il livello di proteine ed il tipo di amminoacidi da esse apportati, i livelli raccomandati nelle prime fasi di crescita, sono elevati sia per coprire i fabbisogni di accrescimento (Trocino *et al.*, 2000), sia per il rinnovo ed il mantenimento della mucosa intestinale, che per i primi 35 giorni di età segue ritmi davvero elevati (Lebas e Laplace, 1972).

L'elevato flusso di proteine nell'ileo, per lo più di origine vegetale, e quindi meno digeribili rispetto a quelle animali rappresentate dalle proteine del latte, può danneggiare la mucosa intestinale ed aumentare il flusso di azoto al cieco con conseguente innalzamento del pH e quindi modificazioni della flora microbica ed insorgenza di patologie a carico del digerente, che si verificano in seguito a meccanismi di esclusione competitivi tra la flora fisiologicamente abitante l'intestino e quella patogena.

L'importanza della riduzione del flusso di proteina nell'ileo (mediante l'utilizzazione di fonti più digeribili o abbassando il livello di proteina) sulla mortalità è stata confermata in diversi studi (García *et al.*, 2004; Chamorro *et al.*, 2005).

Anche il tipo di amminoacidi essenziali, sembra però avere una grande importanza; infatti i meccanismi di difesa della barriera intestinale possono avere uno specifico fabbisogno in amminoacidi. La treonina ad esempio, è un componente maggioritario delle proteine della mucina ed il glutammato, è il principale aminoacido utilizzato dagli enterociti come fonte energetica, è essenziale nei meccanismi di riparazione della mucosa (Le Floc'h e Seve, 2000; Reeds, 2000).

3.4. Svezzamento precoce

Al contrario di quanto succede per l'intestino tenue, in cui lo svezzamento provoca le modificazioni di cui detto sopra, lo sviluppo dell'intestino crasso sembra essere favorito da uno svezzamento precoce (Xiccato *et al.*, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2002; Gallois *et al.*, 2005) e, pertanto, potrebbe prodursi una maggiore colonizzazione batterica in grado di favorire lo sviluppo e la diversificazione del sistema immunitario.

Diversi studi sono stati condotti sulla pratica dello svezzamento precoce, alcuni dei quali hanno dato risultati controversi. Prud'hon e Bel (1968) hanno messo a confronto animali svezzati a 14 e 32 giorni di età ed hanno osservato che gli animali svezzati precocemente si sono adattati bene all'alimento solido, mostrando un peso vivo ad 8-9 settimane, simile a quello che avevano i coniglietti svezzati a 32 giorni, senza mostrare differenze nella percentuale di mortalità.

McNitt e Moody (1992) e Ferguson *et al.* (1997), hanno osservato che in conigli svezzati a 14 giorni, l'ingestione e quindi la crescita è stata inferiore rispetto a quella osservata in animali svezzati a 28 giorni, i quali hanno inoltre presentato una mortalità inferiore rispetto ai primi.

Studi più recenti (Xiccato *et al.*, 2000; Trocino *et al.*, 2001) condotti su animali a differente età di svezzamento (21, 25, 28 e 32 giorni) hanno fatto riscontrare che negli animali svezzati ad un'età precoce, il peso a 32 giorni è stato inferiore rispetto a quelli svezzati a 28 o 32 giorni, ma non si sono avute differenze nella mortalità.

Sembra però che ci sia una relazione tra il precoce adattamento all'alimento solido e l'insorgenza delle patologie intestinali, che risulta essere inferiore negli animali che sviluppano questa caratteristica (Pasqual *et al.*, 2001b).

La prevenzione delle alterazioni dell'apparato digerente è perseguibile attraverso una corretta gestione dell'allevamento: svezzamento, ritmi di allevamento, densità di animali, vuoto sanitario ecc.

Lo sviluppo di strategie nutrizionali atte a migliorare l'efficienza del sistema immunitario del digerente e ridurre l'incidenza e le perdite causate dalle patologie digestive, risulta essere molto complicato poiché bisogna tenere in considerazione tutti i fattori implicati di cui detto sopra, ed altri ancora.

Per quanto riguarda invece i vuoti sanitari, a causa di motivi economici spesso non vengono rispettati, per cui quando tali accorgimenti non sono sufficienti a prevenire o limitare

l'insorgenza delle patologie enteriche, è necessario ricorrere, nel coniglio in accrescimento, alla somministrazione di antibiotici a scopo profilattico.

4. IMPIEGO DI ANTIBIOTICI NELL'ALLEVAMENTO ZOOTECNICO

L'impiego di antibiotici come promotori della crescita in produzione animale ha avuto inizio oltre cento anni fa quando Stkstad e Jukes aggiunsero residui della produzione di clorotetraciclina alle diete di pulcini.

L'aggiunta dei residui aveva lo scopo di fornire una fonte di vitamina B12, ma la conseguenza fu una stimolazione della crescita talmente evidente da non poter essere spiegata soltanto con un più adeguato apporto vitaminico (Brezoen *et al.*, 1999).

Ben presto si scoprì che la causa delle migliori performance di accrescimento dei polli risiedeva nell'attività antibiotica dei residui. Quest'osservazione fu rapidamente estesa ad altri antibiotici e ad altre specie animali, portando ad una sempre più ampia diffusione dell'uso di antibiotici a dosi subterapeutiche quali promotori della crescita. Negli ultimi decenni, una notevole quantità di antibiotici sono stati usati in produzione animale sia a scopo terapeutico sia come promotori della crescita.

L'impiego terapeutico consiste nell'utilizzare dosi elevate di antibiotici per periodi di tempo brevi e i principi attivi possono essere iniettati o somministrati per via orale. Nel caso dell'impiego quali promotori della crescita si utilizzano, all'opposto, dosi basse e lunghi tempi di somministrazione. La via di somministrazione è quella orale, attraverso l'alimento. Esiste, comunque, un certo grado di sovrapposizione tra le due modalità d'impiego: si tratta dell'uso degli antibiotici a scopo profilattico.

L'uso profilattico, infatti ha lo scopo di avere un effetto terapeutico ma le modalità di somministrazione si avvicinano a quelle dei promotori della crescita. D'altra parte, l'uso di antibiotici come promotori della crescita può avere un certo margine di azione profilattica. Nelle specie zootecniche a ciclo breve come, per esempio, polli e conigli, l'impiego di antibiotici avverrà necessariamente per un periodo breve.

Sebbene numerose ricerche siano state effettuate per studiare il meccanismo d'azione degli antibiotici promotori della crescita, poco ancora si conosce sui loro effetti pratici. Il fatto che animali germ-free solitamente non rispondono al trattamento con antibiotici promotori della crescita suggerisce fortemente che la loro principale o più immediata azione si espliciti sulla flora batterica intestinale.

In tabella 5 vengono riportati, principalmente sulla base del report della Commissione sugli Antimicrobici come additivi alimentari (1997), ma anche sui lavori di Barton (2000) e Gaskins *et al.* (2002), i più importanti effetti degli antibiotici promotori della crescita. Da evidenziare un certo grado di inibizione dei batteri patogeni, una riduzione nei metaboliti batterici ad azione tossica, un ridotto turnover dell'epitelio, e una riduzione della motilità intestinale.

Nello specifico, due degli effetti degli antibiotici promotori della crescita sono particolarmente stressanti per l'apparato digerente: il basso turnover intestinale poiché una quota maggiore di nutrienti della dieta vengono utilizzati per il mantenimento dell'apparato digerente; e l'inibizione dei patogeni perché è solitamente considerato che gli antibiotici promotori della crescita sono utilizzati molto al di sotto delle concentrazioni antibiotiche inibitorie minime.

È comunemente assunto che gli antibiotici promotori della crescita aiutano a ridurre l'incidenza di malattie e quindi a migliorare le performance degli animali in produzione zootecnica ma è anche ampiamente dimostrato (Barton, 2000) che l'efficienza di queste sostanze è strettamente collegata alle condizioni igienico-sanitarie dell'allevamento.

Tabella 5. principali effetti degli antibiotici promotori della crescita.

Effetti fisiologici		Effetti nutrizionali		Effetti metabolici	
Transito degli alimenti nel canale digerente	R	Ritenzione energetica e proteica	A	Produzione di ammoniaca, amine tossiche e aflatoxine	R
Diametro, lunghezza e peso delle pareti intestinali	R	Perdite energetiche legate alle attività digestive	R	Ossidazione degli acidi grassi	R
Capacità di assorbimento del canale digerente	A	Fabbisogni di amminoacidi limitanti	I	Escrezione fecale di grassi	R
Umidità delle feci	R	Assorbimento di vitamine, microelementi, acidi grassi, glucosio e calcio	I	Sintesi proteiche epatiche	A
Turnover delle cellule della mucosa intestinale	R	Sintesi di vitamine	R	Fosfatasi alcalina intestinale	A
Stress	R	Nutrienti plasmatici	A	Ureasi intestinale	R
Ingestione alimentare	R = A				

R = riduzione; A = aumento

Tuttavia, il molto spesso indiscriminato uso di antibiotici (non soltanto nell'ambito delle produzioni animali) ha avuto come conseguenza la comparsa di ceppi batterici antibiotico resistenti (Kyriakis *et al.*, 1999; Budino *et al.*, 2005; Wegener, 2006).

In particolare ciò che preoccupa la comunità scientifica è la resistenza che viene sviluppata dai ceppi patogeni (Falcao-e-Cunha *et al.*, 2007). Un'analisi pubblicata recentemente sul British Medical Journal (Cars *et al.*, 2008) prospetta un quadro non proprio roseo. Infatti, la rapidità con cui i batteri riescono a sopravvivere agli antibiotici è molto superiore al ritmo con cui le aziende farmaceutiche mettono a punto nuove "armi".

Ogni volta che si usa un antibiotico, alcuni batteri sopravvivono al trattamento. Il ceppo resistente si moltiplica e si rafforza in base al principio della selezione naturale. Davanti al fallimento di un farmaco, l'unica strada è cercarne uno alternativo. Ma l'uso e l'abuso degli antibiotici, riporta sempre l'articolo, si accompagna ad un rallentamento nello sviluppo di nuove medicine. Tra il 1930 e il 1969, più di una dozzina di nuove classi di antibiotici sono entrate in produzione. Ma dal 1970 a oggi sono state individuate solo due nuove classi. E se si vanno a contare le singole etichette approvate dal sistema sanitario americano, dalle 16 del quinquennio 1983-87 si è passati alle 7 di quello 1998-2002.

Le infezioni nosocomiali da *Stafilococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) sono sempre più frequenti. Mentre nel 1989 i ceppi di *Stafilococcus aureus* sensibili agli antibiotici rappresentavano il 99% fra tutti quelli isolati, nel 2002 un'infezione su due era causata invece da ceppi resistenti ai farmaci. I decessi negli ospedali britannici in cui MRSA è menzionato nella cartella clinica sono passati dai 50 del 1993 a 1600 del 2006. Con due miliardi di passeggeri che gli aerei trasportano ogni anno attraverso il globo e la distribuzione mondiale dei cibi, i batteri super-resistenti non conoscono più frontiere. Con il tempo, quindi, gli antibiotici che potranno essere utilizzati saranno in numero sempre più ridotto fino ad una totale impossibilità del loro utilizzo.

Inoltre, il sempre maggiore interesse da parte dei consumatori europei verso la salubrità dei prodotti agro-alimentari, e ad i residui in essi contenuti (Chen *et al.*, 2005; Roselli *et al.*, 2005), ha fatto sì che la Comunità Europea cominciasse ad interessarsi al problema e adottasse una serie di provvedimenti, l'ultimo dei quali consiste, a partire dal 1° gennaio 2006, in un generale divieto all'uso di antibiotici a dosi subterapeutiche (EC Reg. 1831/2003). La Svezia, è stata il primo paese ad avvertire tale esigenza precorrendo di molto i tempi dell'attuazione del divieto. In questo paese infatti, la riduzione dell'utilizzo di tali sostanze è cominciata nel 1986, con il fine di espandere tale intento non solo in campo veterinario, ma anche in quello medico.

Inizialmente ciò che si è verificato in questo paese, è stato un aumento dell'utilizzo degli antibiotici a scopo terapeutico, ma successivamente attraverso una migliore gestione degli allevamenti, mirata alla prevenzione delle malattie (attraverso un maggiore livello igienico, un uso mirato dei farmaci e una gestione più corretta dell'alimentazione), e con il crescente interesse verso la ricerca di nuove molecole che potessero ovviare il problema legato all'uso eccessivo di tali farmaci, si è resa attuabile la condizione attualmente presente in questa realtà (Wierup, 2001; Falcao-e-Cunha *et al.*, 2007).

A differenza di quanto si verifica per gli allevamenti di polli e di maiali, in cui la creazione di programmi di prevenzione che possano assicurare una riduzione dell'utilizzo degli antibiotici è più fattibile, nei conigli europei sottoposti ad allevamento intensivo, il divieto dell'utilizzo di antibiotici è da subito apparso non sempre possibile, a causa delle elevate mortalità nel post-svezzamento legata soprattutto alla comparsa di enteriti spesso ad eziologia multifattoriale, in cui alcuni dei fattori ancora non sono ben conosciuti (Licois, 2004).

Gli Stati membri hanno adottato differenti strategie per prevenire o controllare questi disordini digestivi. Per esempio, in Italia alcune molecole antibiotiche come la Zn-bacitracina, sono state autorizzate per l'uso sperimentale nei mangimi per conigli (Legge italiana, 2006). Tutte le altre molecole ad attività antibiotica possono essere utilizzate come additivi alimentari soltanto sotto prescrizione del medico veterinario aziendale.

Anche in vista di restrizioni sempre più severe sull'uso di antibiotici a dosi subterapeutiche, già da tempo numerosi ricercatori si sono impegnati, nel campo della conigliicoltura e non solo, a cercare delle molecole che possano essere usate come additivi alimentari ed avere un effetto sovrapponibile a quello degli antibiotici.

Per quanto riguarda gli animali monogastrici da reddito, la maggior parte degli studi sulle sostanze da utilizzare come alternativa agli antibiotici, sono stati condotti su specie quali polli e maiali (Thomke e Elwinger, 1998; Doyle, 2001). Nel coniglio, tali studi, non sempre sono espandibili in quanto bisogna tener ben presente le peculiarità digestive che lo contraddistinguono.

Esistono in natura, varie sostanze, commercialmente disponibili, candidate a rappresentare una alternativa agli antibiotici. Allo stato attuale, l'attenzione è stata rivolta in particolare a:

- probiotici;
- prebiotici;
- enzimi;
- acidi organici;
- estratti di piante e olii essenziali.

5.PROBIOTICI

L'interesse verso i probiotici risale al 1908 quando, il biologo russo Elie Metchnikoff propose la tesi che la longevità dei pastori bulgari e caucasici (cioè la frazione della popolazione che arrivava a cento anni) dipendesse dal consumo massiccio di yogurt.

Le ottimistiche conclusioni dello scienziato russo (vedremo che i fermenti classici dello yogurt non sono probiotici) ebbero il merito di attirare l'attenzione della comunità scientifica internazionale sui batteri presenti nello yogurt, i cosiddetti fermenti lattici.

Sono definiti probiotici, le preparazioni di microrganismi vivi che, somministrati nelle giuste quantità, sono in grado di esercitare un effetto positivo sulla salute dell'ospite con il risultato di rafforzare l'ecosistema intestinale sia si tratti di esseri umani che di animali (Fuller, 1989; Hamilton, 2003).

I loro meccanismi di azione sono stati studiati ed ipotizzati da diversi autori (Ziemer e Gibson, 1998; Ouwehand *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 2003), molti dei quali però solo in vitro per cui necessitano di essere comprovati anche in vivo per non rimanere solo delle ipotesi (Thomke e Elwinger, 1998; Guillot, 2001). Tali meccanismi possono così essere riassunti:

- esclusione competitiva con microrganismi patogeni (Fuller, 1989; Sissons, 1989; Bomba *et al.*, 2002);
- inibizione della crescita dei patogeni attraverso la produzione di sostanze tossiche (Mantere-Alhonen, 1995; Guerra *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 2001; Bomba *et al.*, 2002; Marinho *et al.*, 2007);
- stimolazione della produzione di enzimi da parte dell'organismo ospite;
- produzione di vitamine;
- stimolazione del sistema immunitario.

La maggior parte dei microrganismi considerati probiotici sono ceppi di batteri Gram positivi del genere *Bacillus* (*B. cereus*, *var. toyoi*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*) *Enterococcus* (*E. faecium*), *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*), *Pedococcus* (*P. acidilactici*) e *Streptococcus* (*S. infantarius*), ed alcuni funghi come *Saccharomyces cerevisiae*.

Molte delle prove svolte, hanno mostrato effetti positivi dei probiotici, (in particolare per quanto riguarda polli e maiali in accrescimento) anche in condizioni igieniche al disotto del livello ottimale (Thomke e Elwinger, 1998, Simon *et al.*, 2003, Vondruskova *et al.*, 2010) altri invece hanno dato risultati anche negativi in seguito all'utilizzo di queste sostanze (Doyle 2001).

La mancanza di coerenza nei risultati può essere legata a diverse cause relative agli animali (Simon *et al.*, 2003) (dieta, stress, malattie ecc) o ai probiotici utilizzati per le prove (specie, ceppo, preparazione tecnologica, dose di somministrazione ecc).

Le proprietà che i probiotici devono possedere, per essere riconosciuti come tali, sono:

- origine umana;
- Generalmente Riconosciuto Sicuro;
- resistenza ai processi tecnologici;
- resistenza all'acido gastrico e alla bile;
- adesione all'epitelio intestinale;
- capacità di persistere, anche se per brevi periodi, nel tratto gastrointestinale;
- produzione di sostanze antimicrobiche;
- modulazione della [risposta immunitaria](#) dell'ospite;
- influenza delle attività metaboliche dell'ospite (ad esempio assimilazione del colesterolo, produzione di vitamine, attività lattasica).

È stato riportato, in uno studio sviluppato su maialini in accrescimento, che l'azione dei probiotici può essere potenziata da altre sostanze come acidi grassi polinsaturi, maltodestrine o fruttoligosaccaridi (Bomba *et al.*, 2002).

Nei conigli, la letteratura risulta essere molto più scarsa ed in particolare, le prove che tengono in considerazione le attività ciecali o la digeribilità risultano insufficienti, in quanto nella maggior parte dei casi, sono stati studiati gli accrescimenti, la riproduzione e la mortalità degli animali in prova.

Tali studi però hanno fatto riscontrare miglioramenti nella media degli incrementi di peso vivo degli animali e la mortalità si è ridotta in gran parte degli esperimenti effettuati (Falcao-e-Cunha *et al.*, 2007).

In questo momento sono solo due i probiotici approvati dalla UE per i conigli. Uno è il *Bacillus cereus* var. *toyoi*, l'altro invece è un lievito, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC Sc 47. Ad ogni modo l'approccio allo studio dei probiotici relativamente ai loro effetti dovrebbe essere lo stesso di quello utilizzato in umana ed in altre specie zootecniche. Bisognerebbe concentrarsi ad esempio, sulle condizioni chimico fisiche del lume intestinale, sulle attività enzimatiche sull'effetto barriera dell'epitelio intestinale, nonché sugli effetti prodotti nel sistema immunitario.

6. PREBIOTICI

I prebiotici sono un gruppo di composti costituiti da catene carboniose (oligosaccaridi) che non possono essere digerite dai monogastrici, ma possono essere utilizzate dalla microflora intestinale (Fishbein *et al.*, 1988).

I prebiotici possono essere estratti direttamente da fonti naturali (piante, lieviti ecc) oppure essere prodotti in seguito ad idrolisi, o reazione di transglicosilazione, a partire da polisaccaridi (Oku, 1996).

In tabella 6 sono riportati i diversi prebiotici e la loro provenienza.

Tabella 6: Oligosaccaridi non digeribili (OND) usati come prebiotici (Grizard e Barhomeuf, 1999; Zimmermann *et al.*, 2001; Thuohy *et al.*, 2005).

OND	Modalità di produzione
Mannanligosaccaridi (MOS)	Sintesi enzimatica dal mannosio
Galattoligosaccaridi (GOS)	Transgalattosilazione del lattosio con B-galattosidasi di <i>Aspergillus Oryzae</i>
Fruttoligosaccaridi (FOS)	Idrolisi enzimatica dall'inulina/transfruttosilazione del saccarosio
Soiaoligosaccaridi	Estrazione dalla soia
Xiloligosaccaridi	Idrolisi enzimatica dello xilano
Lattulosio	Isomerizzazione del lattosio
Inulina	Isolata dalle radici della cicoria

I prebiotici possono stimolare selettivamente alcune specie di batteri intestinali, che hanno potenziale effetto benefico sulla salute dell'ospite (Gibson e Roberfroid, 1995; Flickinger *et al.*, 2003; Gibson, 2004; Marinho *et al.*, 2007; Rayes *et al.*, 2009).

A differenza dei probiotici, i prebiotici esercitano la loro azione sulla flora già presente a livello intestinale, quindi hanno il vantaggio di evitare l'introduzione di microrganismi esterni, in più non comportano problemi relativi al trattamento tecnologico in quanto resistono ai trattamenti termici, ma anche alle condizioni di acidità che si verificano a livello gastrico.

A prescindere dall'effetto stimolante che attuano sulla flora microbica intestinale, i prebiotici sono in grado di competere con gli agenti patogeni in quanto occupano gli stessi siti di attacco alla mucosa, in secondo luogo sono capaci di stimolare il sistema immunitario intestinale.

L'aggiunta di tali oligosaccaridi alle diete, influisce sulla concentrazione degli AGV, dell'acido lattico e dell'ammoniaca a livello intestinale (Pie et al., 2007).

L'incremento della concentrazione degli acidi grassi a catena corta, stimola l'attività batterica e la proliferazione della flora microbica stabilmente presente nell'intestino. Inoltre, aumentano anche le concentrazioni di butirrato, che rappresenta la principale fonte di energia per gli enterociti (Houdijk et al., 2002; Vondruskova et al., 2010)

Diversi studi hanno messo in luce che, l'effetto ottenuto con l'uso dei prebiotici, varia a seconda del tipo di polisaccaride utilizzato, della modalità di utilizzazione (Patterson e Burkholder, 2003; Lan et al., 2005), e della concentrazione (Mourão et al., 2006). Quest'ultima può essere un importante fattore limitante relativamente agli alti costi che i prebiotici hanno.

Tra i vari oligosaccaridi, i MOS, derivati dalla parete cellulare di *Saccharomyces cerevisiae*, sono considerate la più promettente alternativa agli antibiotici (Koehler, 2006), e si sono dimostrati in grado di prevenire la colonizzazione della mucosa gastroenterica da parte di batteri patogeni, nonché di stimolare la risposta immunitaria locale attraverso l'incremento dell'attività dei macrofagi e dei linfociti T (Lyons e Bourne, 1995).

Il meccanismo d'azione dei MOS è basato su una sorta di esclusione competitiva (Zimmermann et al., 2001; Shim et al., 2005).

Alcuni batteri enterici si attaccano alla superficie intestinale per mezzo delle fimbrie di tipo 1. Una volta attaccati, possono colonizzare l'intestino e causare patologie. Un certo numero di patogeni, compresi gli enteropatogeni e gli enteroemorragici *E. coli*, *Hafnia alvei*, un ceppo di *Citrobacter freundii*, causano lesioni da "attacco" alla mucosa intestinale del coniglio (Agin et al., 1996). Numerosi batteri posseggono fimbrie di tipo 1, che sono specifiche per il mannosio e che determinano l'attacco ai mannosio-recettori sulle cellule intestinali.

Studi in vitro hanno mostrato che l'80 % di *Salmonella typhimurium*, il 67 % di *Salmonella enteritidis* e oltre il 65 % di *E. coli* posseggono fimbrie per l'attacco ai mannosio-recettori (Duguid et al., 1966).

Ulteriori studi in vitro hanno anche dimostrato che la presenza di d-mannosio può inibire l'associazione mediata da fimbrie di tipo 1 tra *E. coli* e mucosa intestinale umana (Ofek et al., 1977) e *Salmonella* ed enterociti del piccolo intestino di ratti (Linguist et al., 1987). Sebbene

il mannosio sia la chiave per l'attacco batterico il suo costo, come già detto in precedenza, per l'impiego in alimentazione animale sarebbe troppo elevato.

Il complesso alfa-1-3 e alfa-1-6 mannano oligosaccardi ramificati (MOS) estratto dalla parete cellulare dei lieviti è 37 volte più efficace del d-mannosio nel legare E. coli (Firon *et al.*, 1983). Quindi i mannani hanno un'effettiva capacità di bloccare i recettori di alcuni batteri patogeni e impedirne l'adesione alla mucosa intestinale.

I carboidrati contenenti mannosio sono presenti nella parete cellulare dei lieviti e, opportunamente estratti, sono facilmente reperibili in commercio. Alcuni studi hanno dimostrato che i MOS possono rappresentare una valida alternativa agli antibiotici nei polli (Samarasinghe *et al.*, 2003; Hooge *et al.*, 2003; Sims *et al.*, 2004).

I MOS hanno determinato miglioramento delle performance di accrescimento nei boiler (Hooge *et al.*, 2003) e nei tacchini (Sims *et al.*, 2004) equivalenti ai risultati ottenuti utilizzando la bacitracina.

È anche stato osservato che i MOS somministrati a dosi più elevate del 2.5 % alle diete per pulcini influenza la composizione della microflora intestinale aumentando il numero di Bifiobacterium sp. e Lactobacillus sp., mentre si riducono i gruppi di Enterobacteriaceae (Fernandez *et al.*, 2002).

Per quanto riguarda i conigli, Fonseca *et al.* (2004) non hanno riscontrato differenze tra le performance di accrescimento di conigli che ricevevano ossitetraciclina o MOS a 2.0 g/kg mentre il tasso di mortalità è risultato significativamente più basso nel gruppo alimentato con MOS.

Pinheiro *et al.* (2004) osservarono che l'aggiunta di 2.0 g/kg MOS alle diete per conigli stimolava lo sviluppo dei villi intestinali e la produzione di acidi grassi volatili riducendo il pH del cieco e il tasso di mortalità.

Recentemente, anche Guedes *et al.* (2009) hanno osservato che l'aggiunta di 2.0 g/kg di MOS alla dieta determina un aumento della concentrazione di acidi grassi volatili nel cieco dei conigli in accrescimento, mentre Pinheiro *et al.* (2009) hanno segnalato che la concentrazione di 1.0 g MOS/kg non è sufficiente per ridurre l'effetto negativo dovuto ad un basso contenuto di fibra nelle diete di conigli in accrescimento.

Mourao *et al.* (2006), confrontando l'effetto dei MOS a 1.0, 1.5 e 2.0 g/kg rispetto alla Zn-Bacitracina su conigli in accrescimento tra 32 e 67 giorni di età non hanno trovato differenze in termini di mortalità e velocità di accrescimento, probabilmente a causa del tasso di mortalità molto basso registrato in azienda (da 1 a 7 %). Tuttavia, la somministrazione di

MOS ha determinato una migliore integrità della mucosa intestinale e ha mostrato anche un migliore effetto contro i comuni patogeni.

Tra gli altri prebiotici utilizzati nell'alimentazione del coniglio, Lebas (1996), ha riscontrato, in seguito all'aggiunta di Fruttoligosaccaridi (FOS) al mangime, una risposta per quanto riguarda l'indice di conversione alimentare, ma non ha riscontrato effetti sull'incremento di peso medio giornaliero, mentre Aguilar *et al.* (1996) nello stesso tipo di disegno sperimentale hanno riscontrato la situazione opposta.

Luick *et al.* (1992) e successivamente Mourao *et al.* (2004), non hanno osservato nessun effetto significativo inseguito all'impiego di FOS alla dieta dei conigli in prova.

Morisse *et al.* (1992), dopo aver introdotto i FOS nelle diete dei conigli in sperimentazione, hanno riscontrato un incremento nella popolazione di *Escherichia coli* fisiologica, un incremento di AGV e un decremento della concentrazione di ammoniaca nel contenuto cecale, rispetto al gruppo controllo.

In seguito all'impiego di Galattoligosaccaridi (GOS) (Peeters *et al.*, 1992; Gidenne, 1995), le performance di conigli all'ingrasso non hanno mostrato differenze statisticamente significative, ma Gidenne (1995) ha riscontrato invece, negli animali trattati, un significativo aumento di morbilità e di mortalità.

Per quanto riguarda la sostituzione con Inulina, Volek *et al.* (2005) hanno comprovato che, negli animali in prova, il pH cecale ha subito una riduzione in seguito all'incremento della concentrazione di acidi grassi volatili; Martens *et al.* (2004) riscontrò precedentemente anche una variazione nella proporzione di butirrato.

7. ENZIMI

L'utilizzo degli enzimi è cominciato negli anni ottanta (Choct, 2006), in quanto prima di allora, oltre al fatto che erano stati destinati ad altri usi, avevano un costo eccessivo e molti di essi risultano essere termolabili e non resistenti alla acidità che incontrano a livello gastrico.

Gli enzimi utilizzati finora, sono rappresentati da beta-glucanasi, xilanasi e fitasi, anche se recentemente sono stati condotti studi su altri enzimi come l' α -1,6 galattosidasi e la β -1,4-mannanasi.

Il meccanismo dei primi due, consiste nel ridurre la viscosità del contenuto intestinale, attraverso l'idrolisi parziale o totale di alcuni polisaccaridi, che rappresentano un substrato fertile per la proliferazione dei microrganismi, rendono inoltre disponibili all'assorbimento

alcuni nutrienti prima che questi raggiungano il tratto intestinale in cui avvengono le fermentazioni, e risultano migliorare anche la flora propria dell'intestino che è facilitata proprio dalla presenza di oligosaccaridi e zuccheri, derivanti dalle idrolisi enzimatiche (Bedford, 2000).

Mc Donald *et al.*, (2001) hanno riportato, in un lavoro condotto sui maiali, che l'aumento della viscosità del contenuto intestinale, stimola la crescita di ceppi patogeni di *Escherichia coli*.

Le fitasi invece agiscono liberando il fosforo presente negli alimenti, il che, si traduce anche in un minor dispendio derivato dall'aggiunta di fosforo ai mangimi, ma anche in una minore escrezione di questo elemento da parte degli animali.

L'utilizzo di enzimi, a differenza di quanto accade nei polli, in cui il loro impiego è largamente attuato, nei conigli la letteratura è molto scarsa.

Remois *et al.*, (1996); Fernandez *et al.*, (1996); Pinheiro e Almeida, (2000); Falcão-e-Cunha *et al.*, (2004); Garcia *et al.*, (2005), non hanno riportato nessun effetto significativo sulle performance nel coniglio, a parte Garcia *et al.*, (2005) che ha registrato una mortalità più bassa in seguito all'utilizzo di proteasi e proteasi+xilanasi.

Gutiérrez *et al.*, (2002) in seguito all'aggiunta di fitasi alla dieta hanno riscontrato una migliore utilizzazione del fosforo (+24%) nonché un miglioramento della digeribilità dell'azoto.

8. ACIDI ORGANICI

Gli acidi organici ed i loro sali, sono già largamente impiegati nell'industria mangimistica come conservanti, alcuni autori li considerano una valida alternativa agli antibiotici, in particolare nei suini, dove già hanno avuto un notevole successo.

Secondo Partanen e Mroz (1999), formico, acetico, propionico, butirrico, lattico, sorbico, fumarico, tartarico e citrico sono i più promettenti di acidi organici a questo riguardo. L'attività antimicrobica degli acidi organici, è sostanzialmente la stessa, indipendentemente dal fatto che si parli di alimenti, mangimi o lume intestinale (Diebold e Eidelsburger, 2006). Essi infatti, oltrepassano nella loro forma indissociata, la parete cellulare dei microrganismi. Qui tendono a dissociarsi liberando anioni, che agiscono sul metabolismo dell'ospite attraverso l'inattivazione di alcuni enzimi ed altri sistemi.

Questo tipo di attività è svolta per lo più da acidi a corta catena come l'ac formico, acetico, propionico e lattico (Kirchgessner *et al.*, 1992; Roth *et al.*, 1998; Partanen *et al.*, 2001). Altri acidi, come ad esempio ac. fumarico e ac citrico, esplicano la loro azione antimicrobica in maniera indiretta, essi infatti abbassano il pH a livello gastrico. L'abbassamento del pH, oltre a svolgere un effetto barriera verso i microrganismi introdotti con gli alimenti, fa anche sì che si attivino enzimi proteolitici; questo effetto risulta essere di grande importanza in particolare per i suinetti svezzati precocemente in cui l'ingestione di alimento può essere tale da non rendere sufficiente l'acidificazione da parte dello stomaco, il che si traduce in una propagazione di microrganismi a livello intestinale (Castro 2005; De Freitas *et al.*, 2006; Marinho *et al.*, 2007).

La concentrazione minima di acidi organici necessaria per inibire i microrganismi patogeni è stata misurata in vitro (Strauss e Hayler, 2001 citazione da Diebold and Eidelsburger, 2006; Mroz, 2005), e sembra dipendere sia dal tipo di acido utilizzato, che dalla specie batterica da inibire, quindi la combinazione di più acidi, può migliorare l'efficacia ed ampliare lo spettro di azione di questi ultimi.

La combinazione di acidi organici con oli essenziali concentrati, quali ad esempio timolo e carvacolo (estratti da piante del genere *Tymus* e dall'origano), può anch'essa migliorare la funzione degli acidi organici. Gli oli essenziali infatti, danneggiano la parete cellulare dei patogeni, consentendo un più facile ingresso agli acidi (Varley, 2002; Namkung *et al.*, 2004;. Kommera *et al.*, 2006).

Nei conigli, anche in questo caso, risultano scarsi i dati in letteratura.

Recentemente alcuni ricercatori brasiliani (Scapinello *et al.*, 2001; Michelan *et al.*, 2002) in seguito all'introduzione di acido fumarico nel mangime per conigli in accrescimento, hanno riportato un miglioramento sia nell'incremento di peso giornaliero che nell'efficienza di utilizzazione alimentare, anche se le differenze con i gruppi controllo non sono state statisticamente significative.

Skøivanová e Marounek (2002), in seguito all'aggiunta di 5g/kg di mangime di acido caprilico, hanno riportato una riduzione della mortalità in fase di post- svezzamento, ed in un lavoro successivo (2006) in seguito all'utilizzo di acidi grassi esterificati a catena media, hanno raggiunto gli stessi risultati, ovvero una diminuzione della mortalità, ma nessun altro effetto sulle performance.

9. ESTRATTI VEGETALI

Da secoli nella medicina tradizionale vengono utilizzati piante ed estratti vegetali. Dopo il divieto dell'utilizzo degli antibiotici come promotori della crescita, è cominciato l'utilizzo di additivi naturali (piante e spezie) nei mangimi per polli e suini come alternativa agli antibiotici (Borovan, 2004; Hernandez *et al.*, 2004).

L'impiego di estratti vegetali ed olii essenziali è avvenuto in particolare per sfruttare il loro potere antimicrobico (Namkung *et al.*, 2004; Brambilla e De Filippis, 2005; Costa *et al.*, 2007) ed anti-infiammatorio; inoltre è stato dimostrato che alcuni di essi, grazie alle loro proprietà immunologiche e farmacologiche, possono avere effetto profilattico contro una serie di disturbi enterici (Laine *et al.*, 2008).

L'attività antibatterica degli olii essenziali dipende dalla loro composizione chimica e dalle concentrazioni alle quali vengono utilizzati (Russo *et al.*, 1998). In letteratura è riportato che esiste, inoltre, una sinergia tra gli estratti vegetali e acidi organici (Namkung *et al.*, 2004. Kommera *et al.*, 2006).

L'estratto di aglio è generalmente considerato come il più efficace agente antimicrobico di origine vegetale (Arnault *et al.*, 2003) e studi in vitro hanno dimostrato gli effetti antibatterici di timo (Azaz *et al.*, 2004), origano, chiodi di garofano, cannella (Carson *et al.*, 2006) e ginepro (Pepeljnjak *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda la prevenzione delle malattie diarroiche, è importante concentrarsi sugli estratti e sugli olii essenziali che inibiscono la proliferazione di *E. coli* che è una causa comune delle malattie intestinali.

Khan *et al.* (2009) hanno riportato che alcuni ceppi patogeni di *E. coli* sono sensibili ai seguenti estratti vegetali: *Acacia nilotica*, *aromaticum Syzygium* e *Cinnamum zeylanicum*. Tuttavia, uno dei principali svantaggi degli estratti vegetali risiede nella loro instabilità (Bomba *et al.*, 2006), legata a fattori come il clima, la stagione, il metodo di raccolta e altri (Borovan, 2004). Probabilmente per questo motivo in letteratura vengono riportati risultati controversi.

Losa e Kohler (2001), utilizzando una preparazione di olii essenziali negli alimenti per polli, hanno registrato una riduzione della concentrazione di *Clostridium perfringens* a livello intestinale, ma nessun effetto sulle performance di accrescimento.

Costa *et al.* (2007), in uno studio sulle performance di suini in accrescimento, hanno riscontrato, utilizzando gli estratti di chiodi di garofano e origano, performance simili a quelle registrate nel gruppo trattato con antibiotici.

Nei conigli, Botsoglou *et al* (2004), hanno osservato che in seguito alla somministrazione di olio essenziale di origano esterificato, non ci sono stati effetti sulle performance, ma è migliorata significativamente la stabilità ossidativa delle carni dei conigli in prova.

Rashwan *et al.* (1996), hanno ottenuto risultati sulle performance in conigli allevati in condizioni di clima caldo.

Ad ogni modo, bisognerebbe selezionare gli estratti effettivamente utilizzabili, standardizzarli e studiarne le potenzialità benefiche che possono avere se associati tra di loro, o con altri additivi (Budzinski *et al.*, 2000; Oetting *et al.*, 2006).

10. SCOPO DELLA TESI

Alla luce di quanto detto nei paragrafi precedenti relativamente alle problematiche legate allo svezzamento, nonché al divieto dell'utilizzo di antibiotici come promotori della crescita, e, considerato il sempre maggiore interesse della comunità scientifica, e del consumatore europeo verso l'ottenimento di prodotti salubri, privi di residui e di conseguenza di management aziendali che tengano sempre più conto del benessere animale nelle sue varie forme, la presente tesi di dottorato, si pone come scopo quello di studiare gli effetti dei prebiotici nell'alimentazione del coniglio come alternativa agli antibiotici

Tra le varie molecole sopra descritte, l'attenzione si è focalizzata in particolare sui mannanoligosaccaridi (MOS) che, tra i prebiotici, sono considerati la più promettente alternativa agli antibiotici (Kocher, 2006).

11. BIBLIOGRAFIA

Agin, T.S., Cantey, J.R., Boedeker, E.C., Wolf, M.K., (1996). Characterization of the eaeA gene from rabbit enteropathogenic Escherichia coli strain RDEC-1 and comparison to other eaeA genes from bacteria that cause attaching-effacing lesions. FEMS Microbiol. Lett. 144, 249–258.

Alus G., Edwards N.A., (1977). Development of the digestive tract of the rabbit from birth to weaning. Proc. Of the Nutrition Society, 36, 3A.

Arnault I, Christides JP, Mandon N, Haffner T, Kahane R, Auger J (2003): High performance ion pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection. Journal of Chromatography 991, 69–75.

ASSALZOO, (2004). Associazione Nazionale Produttori Alimenti Zootecnici. Bilancio di un anno. Assalzo Newsletter, speciale Venezia. Giugno 2004, 5, anno II.

Aular J.C., Roca T., Sanz E., (1996). Fructo-oligosaccharides in rabbit diet. Study of efficiency in suckling and fattening periods. Proc. 6th World Rabbit Congress, F. Lebas (ed), AFC publ., Toulouse, France, Vol. 1, pp.73-77.

Azaz AD, Irtem HA, Kurkcuoglu M, Baser KHC (2004): Composition and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of some Thymus species. Journal of Biosciences 59, 75–80.

Barton M.D. (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. Nutr. Res. Rev., 13, 279-299.

Battaglini M.A., and Grandi A., (1988). Some observation of feeding behavior of growing rabbits. In: Proceedings of the 4th World Rabbit Congress, Budapest, Vol.3. Sandor Holclas, Hercegalom, Budapest, Hungary, pp. 79-87.

Bedford M.R. (2000). Exogenous enzymes in monogastric nutrition – their current value and future benefits. *Anim. Feed Sci. Techn.*, 86, 1-13.

Bellier R., Gidenne T and Collin M. (1995). In vivo study of circadian variation of the caecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *Journal of Animal Sciences* 73, 128-135.

Bellier R., and Gidenne T., (1996). Consequences of reduced fibre intake on digestion, rate of passage and caecal microbial activity in the young rabbits. *British Journal of Nutrition* 75, 353-363.

Bennegadi N., Gidenne T., Licois D., (2000). Non specific enteritis in the growing rabbit: detailed description and incidence according to fibre deficiency and sanitary status.

Bernadac A., Moreau H., Verger R., (1991). Gastric lipase and pepsinogen during the ontogenesis of rabbit gastric glands. *Europ. J. of Cellular Biology*, 55, 149-157.

Bittante G., Andrighetto I., Ramanzin M., (1993). *Tecniche di produzione animale*. Liviana

Blas E., Fandos J.C., Cervera C., Gidenne T., Perez J.M.,(1990). Effect de la nature et du taux d'amidon sur l'utilisation digestive de la ration chez le lapin au cours de la croissance. *Proc. 5èmes Journées de la Recherche Cunicole*, Paris, France, Communication 50, 9.

Blas E., Gidenne T.,(1998). Digestion of starch and sugar. In: De Blas C., Wiseman J. (Eds.). *The Nutrition of the Rabbit*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 17-38.

Bomba A., Nemcova R, Gancarcikova S, Herich R, Guba P, Mudronova D (2002): Improvement of the probiotic effect of microorganisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosacharides and polyunsaturated acids. *British Journal of Nutrition* 88, 95–99.

Bomba A, Jonecova Z, Koscova J, Nemcova R, Gancarikova S, Mudronova D, Scirankova L, Buleca V, Lazar G, Posivak J, Kastel R, Marekova M (2006): The improvement of probiotics efficacy by synergistically acting components of natural origin: a review. *Biologia* 61, 729–734.

Borovan L (2004): Plant alkaloids enhance performance of animals and improve the utilizability of amino acids (in Czech). *Krmivarstvi* 6, 36–37.

Borovan L (2004): Plant alkaloids enhance performance of animals and improve the utilizability of amino acids (in Czech). *Krmivarstvi* 6, 36–37.

Botsoglou N.A., Florou-Paneri P., Christaki E., Giannenas I., Spais A.B., (2004). Performance of rabbits and oxidative stability of muscle tissues as affected by dietary supplementation with oregano essential oil. *Arcj . Anim. Nutr.*, 58, 209-218.

Brambilla G, De Filippis S (2005): Trends in animal feed composition and possible consequences on residue tests. *Analytica Chimica Acta* 529, 7–13.

Brezoen A., Van Haren W., Hanekamp J.C. (1999). Emergence of a debate. AGPs and Public Health. *Human Health and Antibiotic Growth Promoters (AGPs): Reassessing the risk.* Heidelberg Appeal Nederland Foundation, 131 pp.

Budino FEL, Thomaz MC, Kronka N, Nakaghi LSO, Tucci FM, Fraga AL, Scandolera AJ, Huaynate RAR (2005): Effect of probiotic and prebiotic inclusion in weaned piglet diets on structure and ultra-structure of small intestine. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 6, 921–929.

Budzinski JW, Foster BC, Vandenhoeck S, Arnason JT (2000): An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. *Phytomedicine* 7, 273–282.

Campin, J., Eiras, P., Rebollar, P.G., Carabaño, R., (2003). Estudio del tejido linfoide asociado a intestino en gazapos en torno al destete. *ITEA* 24:660-662. *Canadian Journal of Animal Science* 84, 697–704.

Carabaño R. and Merino J.M., (1996). Effect of ileal cannulation on feed intake, soft and hard faeces excretion throughout the day in the rabbits. In: Lebas, F. (ed) Proceedings of the 6th World Rabbit Congress. Association Française de Cuniculture, Lempdes, Toulouse, pp. 121-126.

Carabaño R. And Piquer J.(1998). The digestive system of the rabbit. CAB INTERNATIONAL. The nutrition of the rabbit, pp: 1-16.

Carabaño, R., García, J., De Blas, C., (2002). Nitrogen digestion and digestive disorders at weaning. A review. pp 42-45. In Proc. Joint Scientific Meeting WG1 (Reproduction) and WG4 (Nutrition) – COST Action 848 & ECVAN, Ispra (Varese), Italy.

Carabaño R., Badiola I., Chamorro S., Garcia-Ruiz A.I., Garcia-Rebollar P., Gómez-Conde M.S., Gutiérrez I., Nicodemus N., Villamide M.J. and de Blas J.C. (2008). Review. New trends in rabbit feeding: influence of nutrition on intestinal health. Spain Journal of Agricultural Research 6 (special issue), 15-25.

Carson CF, Hammer KA, Riley TV (2006): Melaleuca alternifolia (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. Clinical Microbiology Reviews 19, 50–62.

Castro M (2005): Use of additives on the feeding of monogastric animals. Cuban Journal of Agricultural Science 39, 439–445.

Castrovillari C., Greppi G., (1990). Recenti acquisizioni sull'alimentazione del coniglio. Riv. Coniglicoltura 27 (6), 43-54.

Chamorro, S., Gómez-Conde, M.S., Pérez de Rozas, A.M., Badiola, I., Carabaño, R., De Blas, C., (2005). Efecto del nivel y tipo de proteína en piensos de gazapos sobre los parámetros productivos y la salud intestinal. pp. 135-142 in Proc. XXX Symposium deCunicultura de ASESCU, Valladolid, Spain.

Cheeke P. R., (1987). Rabbit Feeding and Nutrition. Academic Press Inc., Orlando, Florida, USA, 376.

Chen YJ, Kwon OS, Min BJ, Son KS, Cho JH, Hong JW, Kim IH (2005): The effects of dietary Biotite V supplementation as an alternative substance to antibiotics in growing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 18, 1642–1645.

Chiou, P.W.S., Yu, B., Lin, C., (1994). Effects of different components of dietary fibre on intestinal morphology of domestic rabbits. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 108:629-638.

Choct M. (2006). Enzymes for the feed industry: past, present and future. *World's Poultry Sci. J.*, 62, 3, 5-15.

Coniglio Veneto, (2002). *La Coniglicoltura nella Regione Veneto. Indagine conoscitiva.*

Costa LB, Panhoza Tse ML, Miyada VS (2007): Herbal extracts as alternatives to antimicrobial growth for weanling pigs. *Brazilian Journal of Animal Science* 36, 589–595
CuniScience 1, 16-27.

Dalle Zotte, A., (2002). Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. *Review. Livest. Prod .Sci.*, 75, 11-32.

Dasso, J.F., Obiakor, H., Bach, H., Anderson, A.O., Mage, R.G., (2000). A morphological and immunohistological study of the human and rabbit appendix for comparison with the avian bursa. *Devolp. Comp. Immol.* 24:797-814

De Blas J. C., Mateos G. G., (1998). *Feed Formulation.* In De Blas C., Wiseman J. (Eds) *The Nutrition of the Rabbit* CABI Publishing. CAB International, Wallingford Oxon, UK, 241-253.

De Blas, C., García, J., Carabaño, R., (1999 b). Role of fibre in rabbit diets. A review. *Ann. Zootech.* 48:3-13.

De Freitas LS, Lopes DC, De Freitas AF, Carneiro JDC, Corassa A, Pena SDM, Costa LF (2006): Effects of feeding organic acids for piglets from 21 to 49 days. *Brazilian Journal of Animal Science* 35, 1711–1719 della realtà produttiva regionale. Regione del Veneto, Piano di Sviluppo Rurale, 135 p.

Diebold G., Eidelsburger U. (2006). Acidification of diets as an alternative to antibiotic growth promoters. In D. Barug, J. de Jong, A.K. Kies, M.W.A. Verstegen (Eds.) Antimicrobial Growth Promoters. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 311-327.

Dojana N., Costache M., Dinischiotu A., (1998). The activity of some digestive enzymes in domestic rabbits before and after weaning. *Anim. Sci.*, 66, 501-507.

Doyle M.E. (2001). Alternatives to antibiotic use for growth promotion in animal husbandry. FRI Briefings, April 2001, 17.

Duguid, J.P., Anderson, E.S., Campbell, I., (1966). Fimbriae and adhesive properties in salmonellae. *J. Pathol. Bacteriol.* 92, 107–138.
Editrice, Padova, p. 408.

El-Adwy M.M. (1996). The influence of caecotomy on composition and excretion rate of soft and hard faeces, feed and water intake in rabbits. In: Lebas, F. (ed) Proceeding of 6th World Rabbit Congress, Toulouse. Association Française de Cuniculture, Lemdes, France, pp. 145-149.

Falcão-e-Cunha L., Reis J., Freire J.B., Castro-Solla L. (2004). Effects of enzyme addition and source of fiber on growth and fibrolytic activities of growing-finishing rabbits. In Proc.: 8th World Rabbit Congress, Puebla, México, 1532-1537.

Falcão-e-Cunha L., Castro-Solla L., Maertens L., Marounek M., Pinheiro V. Freire J., Mourão J.L. (2007). Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: a review. *World Rabbit Sci.* 15, 127-140.

Ferguson F.A., Lukefahr S.D., McNitt J.I., (1997). A technical note on artificial milk feeding of rabbit kits weaned at 14 days. *World Rabbit Sci.*, 5. 65-70.

Fernández C., Merino J.M., Carabaño R. (1996). Effect of enzyme complex supplementation on diet digestibility and growth performance in growing rabbits. In Proc.: 6th World Rabbit Congress, Toulouse, France, 163-166.

Fioramonti J. and Ruckebush Y. (1976). La motricité caecale chez le lapin.3. Dualité de l'excretion fécale. *Annales de Recherches Vétérinaires* 7, 281-295.

Firon N., Ofek I., Sharon N. (1983). Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. *Carbohydr. Res.* 120, 235–249.

Fishbein L., Kaplan M., Gough M.(1988). Fructooligosaccharides: a review. *Vet. Hum. Toxicol.*, 30., 104-107.

Flickinger E., Van Loo J., Fahey G.C., (2003). Nutritional responses to the presences of inulin and oligofructose in the diets domesticated animals: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 43, 19-60.

Forthn-Lamothe L.and Gidenne T. (2006). Recent advances in the digestive physiology of the growing rabbit. *Recent Advances in Rabbit Sciences*, pp. 201-210.

Fuller R (1989): Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365–368.

Gallois, M., Gidenne, T., Fortun-Lamothe, L., Le Huerou-Luron, .I, Lalles, J.P., 2005. An early stimulation of solid feed intake slightly influences the morphological gut maturation in the rabbit. *Repr. Nutr. Dev.* 45:109-122

García, A.I., García, J., de Blas, C., Piquer, J., Carabaño, R., (1997). Efecto de la fuente de fibra sobre la actividad enzimática de la amilasa pancreática y las sacarosas en yeyuno e íleon. *ITEA* 18(1): 190-192.

García A.I., García J., Corrent E., Chamorro, S., García-Rebollar P., De Blas C., Carabaño R. (2005). Effet de l'âge du lapin, de la source de protéine et de l'utilisation d'enzymes sur les digestibilités apparentes de la matière sèche et de la protéine brute sur un aliment lapin. In *Proc.: 11èmes Journées de la Recherche Cunicole*, Paris, France, 197-200.

García Rebollar P., Espinosa A., Lorenzo P.L. and Caratano R. (2004). Transitory disturbances in growing lactating rabbits after transient doe-litter separation. *Reproduction Nutrition and Development* 44, 437-447.

García, J., García, A.I., García-Rebollar, P., de Blas, C., Carabaño, R. (2004). Effects of source of protein and enzyme supplementation on performance of fattening rabbits. pp 427-432 in Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, México

Gaskins H.R., Collier C.T., Anderson D.B. (2002). Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Anim. Biotechnol.*, 13, 29- 42.

Gibson GR, Roberfroid M (1995): Dietary modulation of the human colonic microbiota-introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401–1412.

Gibson GR (2004): From probiotics to prebiotics and a healthy digestive system. *Journal of Food Science* 69, 141–143.

Gidenne T. and Poncet C. (1985). Digestion chez le lapin en croissance, d'une ration à taux élevé de constituants pariétaux: étude méthodologique pour le calcul de digestibilité apparente, par segment digestif. *Annales de Zootechnie* 34, 429-446.

Gidenne T., (1995). Effect of fibre level reduction and gluco-oligosaccharide addition on the growth performance and caecal fermentation in the growing rabbit. *Anim. Feed Sci. technology*, 56, 253-263.

Gidenne T., (1996). Nutritional and ontogenetic factors affecting rabbit caeco-colic digestive physiology. Proc. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, France, Vol. 1, 13-28.

Gidenne T., Bellier R., (2000). Use of digestible fibre in replacement of available carbohydrates-effect on digestion, rate of passage and caecal fermentation pattern during the growth of the rabbit. *Livest. Prod. Sci.* 63, 141-152

Gidenne T., Fortun-Lamothe L. (2002). Feeding strategy for young rabbits around weaning: a review of digestive capacity and nutritional needs. *Animal Sci.* 75, 169-184.

Gidenne T., (2003). Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livest. Prod. Sci.*, 81, 105-117.

Gidenne T., Garcia J., (2006). nutritional strategies improving the digestive health of the

Grizard D, Barthomeuf C (1999): Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reproduction Nutrition Development* 39, 5–6.

Guerra NP, Bernardez PF, Mendez J, Cachaldora P, Castro LP (1997): Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology* 134, 89–107.

Guillot J.F. (2001). Consequences of probiotics release in the intestine of animal. In J. Brufeu (Ed.) *Feed Manufacturing in the Mediterranean Region Improving Safety: from feed to food*. Zaragoza CIHEAM-IAMZ, 17-21.

Gutiérrez I., Espinosa A., García J., Carabaño R., De Blas J C. (2002). Effects of exogenous phytase on phosphorous and nitrogen digestibility in growing-finishing rabbits. In *Proc.: 7th World Rabbit Congress, Valencia, Spain*, 277-281.

Gutiérrez I., Espinosa A., García J., Carabano R., De Blas J.C., (2002). Effect of levels of starch, fiber, and lactose on digestion and growth performance of early-weaned rabbits. *J. Anim. Sci.* 80, 1029-1037.

Hamilton-Miller J.M.T., Gibson G.R., Bruck W. (2003). Some insights into the derivation and early uses of the word “probiotic”. *Brit. J. Nutr.*, 90, 845.

Henshel M.J., (1972). The digestion and absorption of protein in the gut of the neonatal rabbit. *National Academic Awards*, 22, 205.

Hernandez F, Madrid J, Garcia V, Orengo J, Megias MD (2004): Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science* 83, 169–174.

Hooge, D.M., M.D. Sims, A.E. Sefton, A. Connolly and P.S. Spring, (2003). Effect of dietary mannan oligosaccharide, with or without bacitracin or virginiamycin on live performance of broiler chickens at relatively high stocking density on new litter. *J. Appl. Poult. Res.*, 12: 461-467

Houdijk JGM, Hartemink R, Verstegen MWA, Bosch MW (2002): Effects of dietary non-digestible oligosaccharides on microbial characteristics of ileal chyme and faeces in weaner pigs. *Archives of Animal Nutrition* 56, 297–307. Hu CH, Xia MS (2006)

Kelly, D., Conway, S., Aminov, R., (2005). Commensal gut bacteria: mechanisms of immune

Khan R, Islem B, Akram M, Shakil S, Ahmad A, Ali SM, Siddiqui M, Khan AU (2009): Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules* 14, 586–597

Kirchgessner M, Gedek B, Wiehler S, Bott A, Eidelsburger U, Roth FX (1992): Influence of formic-acid, calciumformate and sodiumhydrogencarbonate on the micro flora in different segments of the gastrointestinal tract. 10. Investigations about the nutritive efficacy of organic acids in the rearing of piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 68, 73–81.

Knight, K.L., Winstead, C.R., (1997). Generation of antibody in rabbits. *Current Opinion. Immunology* 9: 228-232.

Kocher A. (2006). Interfacing gut health and nutrition: the use of dietary pre- and probiotics to maximise growth performance in pigs and poultry. In D. Barug, J. de Jong, A.K. Kies, M. W.A. Verstegen (Eds.) *Antimicrobial Growth Promoters*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 289-310.

Kommerer SK, Mateo RD, Neher FJ, Kim SW (2006): Phytobiotics and organic acids as potential alternatives to the use of antibiotics in nursery pig diets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 19, 1784–1789.

Kulwich R., L. Struglia e P.B. Pearson, (1953). The effect of coprophagy on the excretion of B vitamin by the rabbit. *J. Nutr.* 49: 639-645.

Kyriakis SC, Tsiloyiannis VK, Vlemmas J, Sarris K, Tsinas C, Alexopoulos C, Jansegers L (1999): The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. *Research in Veterinary Science* 67, 223–228.

Laine TM, Lyytikainen T, Yliaho M, Anttila M (2008): Risk factors for post-weaning diarrhoea on piglet producing farms in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica* 50, 21.

Lan Y., Verstegen S., Tamminga S., Williams B.A. (2005). The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. *World's Poultry Sci. J.* 61, 3, 95-104.

Lanning, D., Sethupathi, P., Rhee, K.J., Zhai, S.K., Knight, K.L., (2000a). Intestinal microflora and diversification of the rabbit antibody repertoire. *J. Immunol.* 165: 2012-9

Le Floc'h, N., Séve, B., (2000). Le devenir des protéines et des acides aminés dans l'intestin du porc : de la digestion à l'apparition dans la veine porte. *Prod. Anim.* 13: 303-314.

Lebas F., Laplace J.P., (1972). Mensurations viscérales chez le lapin. 1) Croissance du foie des reins et des divers segments intestinaux entre 3 et 11 semaines d'âge. *Annales de Zootechnie*, 21, 37-47.

Lebas, F., Laplace, J.P., (1972). Mensurations viscérales chez le lapin. I. Croissance du foie, des reins et des divers segments intestinaux entre 3 et 11 semaines d'âge. *Ann. Zootech.* 21: 337-347.

Lebas F. and Laplace J.P. (1974). Note sur l'excretion fécale chez le lapins. *Annles de Zootechnie* 23, 577-581

Lebas F. and Laplace J.P. (1975). Le transit digestif chez le lapin.5. Evolution de l'excretion fécale en fonction de l'heure de distribution de l'aliment et du niveau de rationnement durante les 5 jours qui suivent l'application de ce clenier. *Annles de Zootechnie* 24,613-627.

Lebas F., (1989). Besoins nutritionnels des lapin, revue bibliographique et perspectives.

Lebas F., (1996). Effects of fructo-oligosaccharides origin on rabbit's growth performances in 2 season. Proc. 6th World Rabbit Congress., F. Lebas (ed.), AFC publ., Toulouse France, Vol.1, pp. 211-215.

Lebas F., Coudert P., De Rochambeau H., Thébault R.G.,(1997). In: the rabbit-Husbandry, Health and Production (2d edition) FAO publ., Rome, 223 pp.

Legge italiana. 2006. Ordinanza del Ministero della Salute del 18 Febbraio (2006). Differimento e modifica del piano controllato d'impiego sperimentale della zincobacitracina per l'enterocolite enzootica del coniglio, di cui all'ordinanza del Ministro della salute del 7 maggio 2002. Gazzetta ufficiale della Repubblica Italiana No 80. <http://www.ilprogressoveterinario.it/leggi/2006/37.htm>

Licois D., (2004). Domestic rabbit enteropathies . proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla Mexico, C. becerril and A. Pro (Eds), Pueble Mexico, pp. 385-403.

Linquist, B.L., Lebenthal, E., Lee, P.C., Stinson,M.W., Merrick, J.M., (1987). Adherence of Salmonella typhimurium to small-intestinal enterocytes of the rat. Infect. Immun. 55, 3044–3050.

Losa R., Kohler B., (2001). Prevention of colonisation of Clostridium perfringens in broilers intestine by essential oils. Proc. 13th Eur. Symo. Poult. Nutr., Blankenberge, Belgium, 133.

Luick B.R., El-Sayaad A.E., Cheeke P.R., (1992). Effect of fructo-oligosaccharides and yast culture on growth performance of rabbits. J. appl. Rabbit Res, 15, 1121-1128.

Lyons TP, Bourne S (1995): Principles of the effect of probiotics on the basis of yeasts and mannans. In: Proceedings of Conference on Probiotics in animal nutrition, Pohorelice, Czech Republic, 13–22.

Maertens L. (1992). Rabbit nutrition and feeding: a review of some recent developments. Journal Applied Rabbit Research 15, 889-913.

Maertens L., Aerts J., De Boever J., (2004). Degradation of dietary oligofructose and inulin in the gastrointestinal tract and the effect on pH and volatile fatty acids. *World Rabbit Science*, 12, 235-246.

Mage R., (1998). Immunology of lagomorphs. In: *Handbook of Vertebrate immunology*. Gabriel P. Pastoret P.P., Bazin H., Govaerts A. (Eds), Academic Press Limited, pp. 673.

MANIERO C., (2008). Studio di mercato per la promozione e la valorizzazione della carne di coniglio sul mercato europeo. Coniglio Veneto. FAO, 2008. <http://faostat.fao.org>

MantereAlhonen S (1995): Propionibacteria used as probiotics – a review. *Lait* 75, 447–452

Marinho MC, Lordelo MM, Cunha LF, Freire JPB (2007): Microbial activity in the gut of piglets: I. Effect of prebiotic and probiotic supplementation. *Livestock Science* 108, 236–239.

Marounek M., Vovk S.J., Skrivanova V., (1995). distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. *British J. Nutr.*, 73: 463-469.

McDonald D.E., Pethick D.W., Mullan B.P., Hampson D. J., (2001). Increasing viscosity of the intestinal contents alters small intestinal structure and intestinal growth, and stimulates proliferation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in newly-weaned pigs. *Brit.J.Nutr.*, 86, 487-498.

McNitt J. I., Moody G.L., (1992). A method for weaning rabbit kits at 14 days. *J. Appl. Rabbit Res.*, 15, 661-665.

Michelan A.C., Scapinello C., Natali M.R.M., Furlan A.C., Sakaguti E.S., Faria H.G., Santolin M.L.R., Hernandez A.B. (2002). Utilização de probiótico, ácido orgânico e antibiótico em dietas para coelhos em crescimento: ensaio de digestibilidade, avaliação da morfometria intestinal e desempenho. *Rev. Bras. Zootec.*, 31, 2227-2237.

modulation. *Trends in immunology* (in press).

Morisse J.P., Maurice R., Boilletot E., Cotte J.P., (1992). Effect of a fructo-oligo-saccharides compound in rabbits experimentally infected with E.coli 0.103. *J.Appl. Rabbit Res* 15, 1137-1143.

Mourao J.L., Alves A., Pinheiro V., (2004). Effect of fructo-ologosaccharides on performances of growing rabbits. *Proc. 8th World Rabbit Congress*. Puebla Mexico, C. Becerril and A. pro (Eds.) Puebla, Mexico, pp. 915-921.

Namkung H, Li M, Gong J. Yu H. Cottrill M, De Lange CFM (2004): Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs.

Nicodemus N., Mateos J., De Blas J.C., Carabano R. And Fraga M.J. (1999). Effect of diet on amino acid composition of soft faeces and the contribution of soft faeces to total amino acid intake, through caecotrophy in lactating doe rabbits. *Animal Science* 69, 167-170.

Nicodemus N., Perez Alba L., Carabano R., De Blas C., Badiola I., Perez De Rozas A., Garcia J., (2004). Effect of level of fibre and level of ground of fibre source on digestion and ileal and caecal characterization of microbiota of early weaned rabbits. *Proc. 8th World Rabbit Congress*, Puebla, Mexico, 928-929.

Oetting LL, Utiyama CE, Giani PA, Ruiz UD, Miyada VS (2006): Effects of herbal extracts and antimicrobials on apparent digestibility, performance, organs morphometry and intestinal histology of weanling pigs. *Brazilian Journal of Animal Science* 35, 1389–1397

Ofek, I., Mirelman, D., Sharon, N., (1977). Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* 265, 623–625.

Oku T. (1996). Oligosaccharides with beneficial health effects: a Japanese perspective. *Nutr. Rev.*, 54 (11): s59-s66.

Orengo O., Gidenne T., (2006). Feeding behaviour and caecotrophy in the young rabbit before weaning: An approach by analysing the digestive contents. *Appl. Animal Behaviour Science* 102, 106-118.

Ouwehand A.C., Kirjavainen P.V., Shortt C., Salminen S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *Intern. Dairy J.*, 9, 43-53.

Padilha T.S.M., Licots D., Gidenne T., Carre B., Fonty G., (1994). Evolution de la microflore et de l'activité fermentaire caecale chez le lapereau pendant la période peri-sevrage: premiers résultats. *Vlèmes Journées de la Recherche Cunicole*, La Rochelle, vol 2, 341-346.

Padilha T.S.M., Licots D., Gidenne T., Carre B., Fonty G., (1994). Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. *Reprod. Nutrit. Develop.*, 35, 375-386.

Parigi Bini R., Xiccato G., Cinetto M., Dalle Zotte A., (1992). Effetto dell'età, del peso di macellazione e del sesso sulla qualità della carcassa e della carne cunicola. 1. Rilievi di macellazione e qualità della carcassa. *Zoot. Nutr. Anim.*, 18, 157-172.

Partanen K., Jalava T, Valaja J, Perttilä S, Siljander-Rasi H, Lindeberg H (2001): Effect of dietary carbadox or formic acid and fibre level on ileal and faecal nutrient digestibility and microbial metabolite concentrations in ileal digesta of the pig. *Animal Feed Science and Technology* 93, 137–155.

Partanen K.H., Mroz Z. (1999). Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr. Res. Rev.*, 12, 117-145.

Pascual J.J. (2001). Early weaning of young rabbits: a review. *World Rabbit Sci.* 9 (4), 165-170.

Pascual J.J., Cervera C., Fernandez-Carmona J. (2001b). Effect of solid food intake before weaning on the performance of growing rabbits. 2th Meeting of workgroup 3 and 4. COST Action 848. Godollo. Hungary.

Patterson J.A., Burkholder K.M. (2003). Prebiotic feed additives: rationale and use in pigs. In *Proc.: 9th Intern. Symp. on Digestive Physiology in Pigs*, Banff, AB, Canada, 319-331

Peeters J.E., Maertens L., Geeroms R., (1992). Influence of galacto-oligosaccharides in zootechnical performance, cecal biochemistry and experimental colibacillosis O103/8+ in weanling rabbits. *J. Appl. Rabbit Res.*, 15, 1129-1136.

Peters J. E., (1992). Patologie del digerente. *Riv. Coniglicoltura* 29 (9), 17-20

Pepeljnjak S, Kosalec I, Kalodera Z, Blazevic N (2005): Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). *Acta Pharmaceutica* 55, 417–422

Piattoni F., Maertens L., Demeyer D., (1995). Age dependent variation of caecal contents composition of young rabbits. *Arch. Anim. Nutr.*, 48, 347-355.

Pie S, Awati A, Vida S, Falluel I, Williams BA, Oswald IP (2007): Effects of added fermentable carbohydrates in the diet on intestinal proinflammatory cytokinespecific mRNA content in weaning piglets. *Journal of Animal Science* 85, 637–683.

Pinheiro V., Almeida A. (2000). Efeito da adição de pentosanases em dietas para coelhos em crescimento sobre as performances zootécnicas, saúde dos animais, parâmetros fermentativos cecais e composição química do digesta ileal. In *Proc.: I Jornadas Internacionais de Cunicultura*, Vila Real, Portugal, 209.

Pinheiro V., Gidenne T., Falcao E. Cunha L., (2001). Effect of age on bacterial fibrolytic activity of caecal flora of rabbit. In: *Proc. 2nd Meeting of Work Group Nutrition and Pathology of COST 848*, 29-30 June, Godollo, Ungary, 50.

Portsmouth J.I. (1977). The nutrition of the rabbits. In: Haresign, W., Swan, H. and Lewis, D. (eds) *Nutrition and the Climatic Enviroment*. Butterworths, Lonon, UK, pp. 93-111.
Proc. 7th World Rabbit Congress, 4-7 July 2000, Valencia, Spain, Vol. C, 109-117

Proto V. (1976). Fisiologia della nutrizione del coniglio con particolare riguardo alla ciecotrofia. *Rivista di coniglicoltura* 7, 15-33.

Prud'Hon M., Bel L., (1968). Le sevrage précoce des lapereaux et la reproduction des lapines. *Ann.zootech.*, 17: 23-30.

Rashwan A.A., Ibrahim H., El-Kerdawy Dawalat A., Yamani K.A., (1996). Effect of anise and mint extract (volatile oils) supplementation in the diet of weanling New Zealand white rabbits in hot climate. Proc. 6th World Rabbit Congress, F Lebas (Ed), AFC publ., Toulouse France, Vol.1, pp.283-287.

Rayes N, Seehofer D, Neuhaus P (2009): Prebiotics, probiotics, synbiotics in surgery-are they only trendy, truly effective or even dangerous? Langenbecks Archives of Surgery 394, 547–555.

Reeds, P.J., (2000). Dispensable and indispensable amino acids for humans. J. Nutr. 130: 1835S- 1840S.

Remois G., Lafargue-Hauret P., Rouillere H. (1996). Effect of amylases supplementation in rabbit feed on growth performance. In Proc.: 6th World Rabbit Congress, Toulouse, France, Vol. 1, 289-292.

Roselli M, Finamore A, Britti MS, Bosi P, Oswald I, Mengheri E (2005): Alternatives to in-feed antibiotics in pigs: Evaluation of probiotics, zinc or organic acids as protective agents for the intestinal mucosa. A comparison of in vitro and in vivo results. Animal Research 54, 203–218.

Roth FX, Kirchgessner M (1998): Organic acids as feed additives for young pigs: Nutritional and gastrointestinal effects. Journal of Animal and Feed Sciences 7, 25–33.

Ruckebush Y. and Hornicke H. (1977). Motility of the rabbit's colon and caecotrophy. Physiology and Behavior 18, 871-878.

Russo M, Galletti GC, Bocchini P, Carnacini A (1998): Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtum* letswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 3741– 3746.

Sabatakou O., Xylouri-Frangiadaki E., Paraskevakou E. e Papantonakis K., (1999a). scanning electron microscopi of large intestine (caecum and colon) of rabbit durino foetal and post-natal life. *J. Submicroscopic Cytology and Pathology*, 31, 231-236.

Sabatakou O., Xylouri-Frangiadaki E., Paraskevakou E. e Papantonakis K., (1999b). scanning electron microscopi of stomach and small intestine of rabbit during foetal and post natal life. *J. Submicroscopic Cytology and Pathology*, 31, 107- 114.

Samarinsinghe K., Wenk C., Silva K.F.S.T., Gunasekera J.M.D.M. (2003). Turmeric (*Curcuma longa*) root powder and mannano-oligosaccharides as alternatives to antibiotics in broiler chickens diet. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 10: 1495-1500.

Scapinello C., Garcia de Faria H., Furlan A.C., Michelan A.C. (2001). Efeito da utilização de oligossacarídeo manose e acidificantes sobre o desempenho de coelhos em crescimento. *Rev. Bras. Zootec.*, 30, 1272-1277.

Shim SB, Verstegen WA, Kim IH, Kwon OS, Verdonk JMAJ (2005): Effects of feeding antibiotic-free creep feed supplemented with oligofructose, probiotics or synbiotics to suckling piglets increases the preweaning weight gain and composition of intestinal microbiota. *Archives of Animal Nutrition* 59, 419–427.

Simon O., Vilfried V., Scharek L. (2003). Micro-organisms as feed additives – probiotics. In *Proc.: 9th Intern. Symp. on Digestive Physiology in Pigs*, Banff, AB, Canada, 295-318.

Sims, A. H., Robson, G. D., Hoyle, D. C., Oliver, S. G., Turner, G., Prade, R. A., Russell, H. H., Dunn-Coleman, N. S. & Gent, M. E. (2004). Use of expressed sequence tag analysis and cDNA microarrays of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 41, 199–212.

Sissons JW (1989): Potential of probiotic organisms to prevent diarrhea and promote digestion in farm animals: a review. *Journal of Food and Agriculture Science* 49, 1–13

Skøivanová V., Marounek M. 2002. Effect of caprylic acid on performance and mortality of growing rabbits. *Acta Vet. Brno*, 71, 435-439

Skøivanová V., Marounek M. (2006). A note on the effect of triacylglycerols of caprylic and capric acid on performance, mortality, and digestibility of nutrients in young rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 127, 161-168.

Spreadbury, D. (1978). A study of the protein and amino acid requirement of the growing New Zealand White rabbit, with emphasis on lysine and the sulphur containing amino acids. *British Journal of Nutrition* 39, 601-613.

Strauss G., Hayler R. (2001). Effects of organic acids on microorganisms. *Kraftfutter*, 4, 147-151 (cited by Diebold G., Eidelsburger U., 2006).

Thomke S., Elwinger, K. (1998). Growth promotants in feeding pigs and poultry. III. Alternatives to antibiotic growth promotants. *Ann. Zootech.*, 47, 245-271.

Toofanian F., Targowsky S.P., (1982). Morphogenesis of rabbit small intestinal mucosa. *American J. Vet. Res.*, 43, 2213-2219.

Trocino, A., Xiccato, G., Queaque, P.I., Sartori, A., (2000). Feeding plans at different protein levels: Effects on growth performance, meat quality and nitrogen excretion in rabbits. *World Rabbit Sci.* 8(Supl. 1 C): 467-474.

Trocino, A., Xiccato, G., Sartori, A., Queaque P.I., (2001). Effect of starter diet and weaning age on growth caecal fermentation and body composition of young rabbits. 2th Meeting of workgroup 3 and 4. COST Action 848. Godollo. Hungary.

Tuohy KM, Rouzaud GCM, Bruck WM, Gibson GR (2005): Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-assessment of efficacy. *Current Pharmaceutical Design* 11, 75–90.

Vajdy M., Sethupathi P., Knight K.L., (1998). Dependence of antibody somatic diversification on gut-associated lymphoid tissue in rabbit. *J. immunology*, 160, 2725-2729.

Van Der Hage M.H.,(1988). The morphogenesis of the small intestinal mucosa of the rabbit. A stereomicroscopical study. In: Proc. 4th World Rabbit Congr., Budapest, Hungary, vol. 3, 347-355.

Varley M (2002): Real future for herbal nutraceuticals. Pig Progress 18, 34–35.

Vernary M. and Raynaud P. (1975). Répartition des gras volatils dans le tube digestif du lapin domestique. 1, Lapins alimentés en luzerne et avoine. Annales des Recherches Vétérinaires 6, 357-368.

Volek Z., Marounek M, Skrivanová V., (2005). replacing starch by pectin and inulin in diet of early-weaned rabbits: effect on performance, health and nutrient digestibility. J. Anim. Feed Sci., 14, 327-328.

Vondruskova H., Slamova R., Trckova M., Zraly Z., Pavlik I., (2010). Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. Veterinary Medicina, 55, 199-224.

weaned rabbit. In: Maertens L., Coudert P. (Eds.) Recent Advances in Rabbit Sciences. Ilvo, Merelbeke, Belgium, 229-238

Wegener H.C. (2006). Use of antimicrobial growth promoters in food animals: the risk outweigh the benefits. In D .Barug, J. de Jong, A.K. Kies, M. W.A. Verstegen (Eds.) Antimicrobial Growth Promoters. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 53-58

Wierup M. (2001). The Swedish Experience of the 1986 Year Ban of Antimicrobial Growth Promoters, with Special Reference to Animal Health, Disease Prevention, Productivity, and Usage of Antimicrobials. Microbial Drug Resistance, 7(2): 183-190.

Xiccato G., (1993). Come alimentare il coniglio. Professione allevatore 20 (1). 27-40.

Xiccato G., Trocino A., Sartori A., Queaque P.I., (2000). Early weaning of rabbits: effect of age and diet on weaning and post-weaning performance. In: Proc. 7th World Rabbit Congress, Valencia, Vol. C, 483-490.

Xiccato G., Trocino A., Sartori A., Queaque P.I., (2001). Influence de l'âge, du sevrage précoce et de l'aliment sur le développement des organes digestifs et des fermentations caecales chez le jeune lapin Proc. 9èmes Journ. Rech. Cunicole en France, ITAVI (ed), Paris, France, 199-202.

Xiccato G., Trocino A., (2007). Italia, un sistema de producciòn cunicola integrada. Proc. II Congresso Iberico de Cunicultura, Vila Real, Tràs-os-Montes, Potugal, 175-184.

Yu B., Chiou P.W.S., (1997). The morphological changes of intestinal mucosa in growing rabbits. Lab. Animals, 31, 254-263.

Ziermer C.J., Gibson G. (1998). An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: perspectives and futures strategies. Dairy J., 8, 473-479.

Zimmermann B., Bauer E, Mosenthin R (2001): Pro- and prebiotics in pig nutrition – potential modulators of gut health? Journal of Animal and Feed Sciences 10, 47–56.

Zomborsky-Kovács M., Gayarmati T., Pàrizs T., Szendro Z., Kamelter L., Tòth A., (2000). Some physiological properties of the digestive tract in traditionally reared and exclusively milk-fed young rabbits. In : Proc. 7th World Rabbit Congr., Valence, Spain. World Rabbit Sci., 8, suppl.1, vol. C, 499-506.

12. AZIENDA AGRICOLA MARCIANO ROSA CARMELA

Le prove descritte nei seguenti capitoli sono state effettuate presso l'azienda commerciale "Marciano Rosa Carmela" ubicata nel Comune di S.Giorgio la Molara, in provincia di Benevento (41°16'0" N, 14°55'0" E, 667 m.s.l.m.).

L'indirizzo produttivo è quello cunicolo, specializzato per la produzione di carne.

Il capitale scorte vive si compone di:

- 50 maschi riproduttori;
- 2000 fattrici;
- 25% di rimonta;
- 14500 coniglietti di età inferiore ai 30 giorni;
- 14500 coniglietti all'ingrasso (con una mortalità dell'1%).

I riproduttori maschi sono di razza Californiana, caratterizzati quindi da una muscolatura forte e soda ed una ossatura estremamente leggera.

Le fattrici invece appartengono alla razza Bianca di Nuova Zelanda caratterizzata da corpo a parallelogramma, molto tozzo e raccolto e grande attitudine materna.

L'azienda è formata da 3 capannoni tipo tunnel (48 x 13,5 x 6 m), in ognuno dei quali è presente un reparto fattrice e un reparto ingrasso con gabbie di tipo California, rispettivamente composti da:

- gabbia nido: 5 file da 114 nidi + 2 file da 114 posti rimonta;
- gabbie ingrasso e svezzamento: 7 file da 688 posti in gabbie bicellulari.

Nei capannoni sono inoltre presenti 6 raschiatori meccanici per la pulizia che viene effettuata quotidianamente; 2 vasche da 5 q ciascuna, per la raccolta di acqua da utilizzare per gli abbeveratoi.

Esternamente ai capannoni sono presenti:

- una vasca interrata per la raccolta dei liquami che ha una capacità di 530 m³. Annualmente sono prodotti circa 490 m³ di liquame che vengono poi smaltiti in terreni di proprietà aziendale (circa 11 ha);
- 2 silos da 9 q e 2 da 120 q per lo stoccaggio del mangime;
- una cisterna di 80 q per la raccolta di acqua per la pulizia e il raffrescamento.

L'azienda dispone di un innovativo sistema computerizzato per la distribuzione del mangime alle gabbie. Il sistema computerizzato basa la distribuzione alimentare per fila di gabbie, ognuna composta da 86 mangiatoie (da 600 g) che forniscono l'alimento a 688 conigli. L'alimento viene distribuito nell'arco della giornata in base:

- alla razione giornaliera precedentemente impostata sulle esigenze fisiologiche degli animali;
- al numero di conigli;
- al numero di mangiatoie in funzione che si trovano al momento sulla fila;

Il tutto ripartito tra il numero di minuti della "giornata alimentare" (il tempo totale di una giornata solare in cui è possibile effettuare la distribuzione di alimento), parametro prestabilito dall'allevatore.

Quest'ultimo è particolarmente importante nel periodo estivo durante il quale nelle ore pomeridiane, caratterizzate da un'elevata temperatura, il coniglio non si alimenta. E' possibile, in questi casi, eliminare la distribuzione dell'alimento nelle ore in cui, questa si riveli inutile. Tale sistema di distribuzione consente inoltre, qualora si decida di farlo, di effettuare la distribuzione ad libitum.

L'impianto di ventilazione forzata è di tipo longitudinale, con una areazione di 120000m³/ora.

L'illuminazione durante l'arco delle 24 ore è così distribuita: 16 ore di luce e 8 ore di buio.

Sui riproduttori vengono effettuati i seguenti trattamenti:

- terapia antielmintica con cadenza semestrale;
- vaccino per la Mixomatosi;
- vaccino per la malattia emorragica virale.

Sui conigli in fase di svezzamento invece, si effettuano:

- coccidiostatico, somministrato nel mangime, con eventuale antibiotico per la patologia enterica o respiratoria in atto.

La conduzione aziendale è di tipo familiare con due lavoratori facenti parte della famiglia e un salariato.

La ciclizzazione aziendale è così riassunta:

Lunedì: Fecondazione; svezzamento conigli di 35 gg di età (vengono spostati dalla gabbia nido nelle gabbie bicellulari da ingrasso);

Martedì: 2° pareggiamento nidi dei conigli di 5 gg di età e disinfezione nidi; sistemazione fattrici nelle gabbie nido per il parto del giovedì; diagnosi di gravidanza a 15 gg dalla fecondazione;

Mercoledì: 3° Pareggiamento dei conigli di 13 gg di età e disinfezione nidi; vendita conigli ingrasso;

Giovedì: Scelta della rimonta; parti; pulizia gabbie ingrasso;

Venerdì: 1° pareggiamento nidi dei conigli di 1gg di età; disinfezione nidi;

Sabato: Sincronizzazione estro (per le fecondazioni del lunedì); pulizia generale e disinfezione capannoni;

Domenica: libero.

CAPITOLO 2

INDAGINI PRELIMINARI SULL'IMPIEGO DEI MANNANOLIGOSACCARIDI COME ALTERNATIVA AGLI ANTIBIOTICI NELLA PRODUZIONE DEL CONIGLIO DA CARNE

1. OBIETTIVO DELLA RICERCA

Lo scopo del lavoro è stato quello di studiare l'effetto della sostituzione degli antibiotici con i mannanoligosaccaridi a diverse concentrazioni (0,5; 1,0 e 1,5 g/kg di alimento) sulle performance di accrescimento dei conigli nel periodo post svezzamento (35-56 giorni di età) e durante la fase di finissaggio (57 giorni – età di macellazione) sia sulle performance *in vivo* che su alcune caratteristiche delle carcasse.

2. MATERIALE E METODI

2.1. Animali e management

Per la prova sono stati utilizzati 192 coniglietti appartenenti al tipo genetico ibrido Hyla, svezzati all'età di 35 giorni (peso medio 868,3 g). Gli animali sono stati accasati in gabbie bicellulari (2 conigli per gabbia, per un totale di 96 gabbie) dalle dimensioni 26 X 46 X 35 cm di altezza all'interno dello stesso capannone per evitare che variazioni anche minime del microambiente del capannone potessero inficiare i risultati della prova. Si è quindi provveduto a dividere le gabbie in quattro gruppi (24 gabbie, 48 coniglietti per gruppo) omogenei per peso e sesso degli animali. La prova è durata complessivamente 47 giorni, dallo svezzamento all'età di macellazione degli animali (82 giorni).

2.2. Diete

I coniglietti dei quattro gruppi hanno ricevuto nel periodo di accrescimento e in quello di finissaggio, le stesse diete "basali", le cui composizioni chimiche sono riportate in tabella 1. Le diete utilizzate erano diete commerciali formulate in modo da coprire i fabbisogni nutritivi degli animali secondo le indicazioni di Gidenne (2000).

Tabella 1: Composizione chimica delle diete in fase di svezzamento e finissaggio.

	Dieta di Svezzamento	Dieta di finissaggio
Sostanza secca	87.5	90.82
Ceneri	10.9	6.66
Proteine grezze	16.5	17.60
Lipidi grezzi	3.43	4.62
Fibra grezza	21.6	12.75
NDF	34.1	36.23
ADF	25.7	17.10
ADL	3.57	2.87

I quattro gruppi hanno ricevuto i seguenti trattamenti alimentari applicati alla dieta basale:

- 1) gruppo MOS_0.5, la cui dieta è stata integrata con Bio-Mos® (Alltech, Inc., USA) alla concentrazione di 0,5 g/kg;
- 2) gruppo MOS_1.0, la cui dieta è stata integrata con Bio-Mos® a 1,0 g/kg;
- 3) gruppo MOS_1.5 che ha ricevuto Bio-Mos® a 1,5 g/kg
- 4) gruppo ANT, le cui diete sono state integrate con antibiotici, secondo consuetudine aziendale. In questo caso deve essere segnalato che durante la fase di accrescimento sono stati utilizzati antibiotici a largo spettro (dietro regolare prescrizione del medico veterinario aziendale): colistina solfato 144 mg/kg; tilosina 100 mg/kg e ossitetraciclina 1000 mg/kg. Durante la fase di finissaggio (57 – 82 giorni) è stato invece utilizzato un antibiotico privo di tempi di sospensione (apramicina alla dose di 50 mg/kg) per evitare residui nelle carni. Anche l'apramicina viene di consuetudine utilizzata nell'azienda in cui si è svolta la prova come profilassi per le diverse patologie che possono manifestarsi in allevamento.

Gli animali hanno avuto, per tutta la durata della prova, libero accesso 24 h al giorno sia agli alimenti che all'acqua di bevanda.

2.3. Rilievi effettuati nel corso delle prove

La mortalità è stata registrata quotidianamente. Gli animali sono stati pesati individualmente con cadenza settimanale in modo da poter calcolare l'incremento ponderale giornaliero.

Durante la fase di accrescimento, per problemi legati alla gestione aziendale, non è stato possibile controllare settimanalmente il consumo di alimento che è stato rilevato al termine della prova (56 giorni) per ogni gruppo. Di conseguenza, anche l'indice di conversione alimentare è stato calcolato come valore medio riferito all'intera durata della prova. Per le ragioni appena descritte, non è stato possibile sottoporre tali parametri ad analisi statistica.

Durante la fase di finissaggio si è potuto invece rilevare settimanalmente l'ingestione di alimento sempre come media di gruppo. L'indice di conversione alimentare (ICA) è stato quindi calcolato secondo gli stessi criteri e, anche in questo caso, non è stato possibile sottoporre questi dati ad analisi statistica.

A 82 giorni di età sono stati sacrificati 16 conigli per gruppo scelti in modo da ottenere animali omogenei tra i gruppi per peso e per sesso (rapporto maschi femmine 1:1). La

macellazione è stata effettuata in un macello cunicolo specializzato, nel pieno rispetto delle norme relative al benessere animale.

Tutte le carcasse sono state sezionate come previsto da Blasco et al. (1992), in modo da ottenere le seguenti misurazioni:

- apparato digerente pieno e vuoto (sgrondato),
- pelle,
- parti distali degli arti anteriori e posteriori e coda,
- tratto urogenitale con vescica vuota.

Le carcasse così ottenute sono state quindi pesate e messe a refrigerare a 4°C. Trascorse 24 ore, le carcasse sono state di nuovo pesate in modo da misurare le perdite d'acqua dovute alla refrigerazione e le seguenti parti anatomiche sono state separate e pesate:

- testa,
- fegato privato della cistifellea,
- corata (cuore, polmoni, esofago, trachea, ghiandola del timo,);
- reni privati del grasso perirenale.

Dopo l'asportazione del grasso di deposito (interscapolare e inguinale), le carcasse sono state nuovamente pesate ottenendo la cosiddetta carcassa di riferimento.

2.4. Analisi chimiche

2.4.1. Composizione chimica della dieta

La composizione chimica delle diete basali (accrescimento e finissaggio), comuni a tutti i gruppi, è stata effettuata in accordo con le metodiche proposte dall'AOAC (2004): sostanza secca, metodo numero 934.01; estratto etereo, metodo numero 920.39, ceneri 942.05, proteine grezze 954.01, fibra grezza 945.18; fibra resistente al detergente acido, lignina resistente al detergente acido, metodo numero 973.18; fibra resistente al detergente neutro trattata con alfa amilasi, metodo numero 2002.04.

3. ANALISI STATISTICA

Le differenze tra i gruppi relativamente alle performance in vivo e alle caratteristiche delle carcasse sono state valutate tramite analisi della varianza (SAS, 2000) ad una via, testando l'effetto degli antibiotici o dei diversi livelli di MOS.

Le differenze tra le percentuali di mortalità sono state confrontate mediante test Chi-quadro.

4. RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1. Periodo di accrescimento (35 – 56 giorni)

In linea con quanto segnalato da altri autori (Fonseca et al., 2004; Pinheiro et al., 2004; Mourao et al., 2006) non sono state osservate differenze statisticamente significative tra i gruppi né per il peso vivo né per l'incremento ponderale giornaliero (Tabella 2) nel corso delle tre settimane di prova.

Tabella 2 – Performance in vivo dei conigli tra 35 e 56 giorni di età

giorni	Peso vivo				Incremento ponderale giornaliero			
	(g)				(g/d)			
giorni	35	42	49	56	35-42	42-49	49-56	35-56
MOS_0.5	871	1175	1435	1673	43,5	35,7	34,0	37,7
MOS_1.0	867	1184	1432	1664	43,8	35,5	32,9	37,4
MOS_1.5	867	1183	1445	1662	46,1	35,6	32,8	38,5
ANT	868	1190	1446	1681	46,0	36,5	33,6	38,7
RMSE	64,5	62,7	72,0	78,7	2,77	7,66	3,79	5,62

RMSE: root mean square error

Anche se non è stato possibile effettuare l'analisi statistica, l'ingestione di alimento, determinata come media di gruppo al termine della prova, è risultata più bassa per i gruppi MOS_0.5 e MOS_1.0 (123 e 121 g/d, rispettivamente). Il gruppo MOS_1.5 ha fatto registrare un'ingestione volontaria di alimento pari a 129 g/d, mentre l'ingestione più elevata è stata osservata nel gruppo ANT (136 g/d). Rapportando questi valori all'incremento ponderale giornaliero medio dell'intero periodo, ne risulta che il gruppo ANT ha presentato l'indice di conversione alimentare meno favorevole (3,52) mentre i conigli dei tre gruppi alimentati con mannanoligosaccaridi hanno fatto registrare indici di conversione alimentare molto simili tra loro (3,13, 3,20 e 3,17, rispettivamente per i gruppi MOS_0.5, 1.0 e 1.5).

Il tasso di mortalità non ha fatto registrare differenze statisticamente significative tra i gruppi ed è risultato mediamente pari a 6,25%.

I risultati, anche se ottenuti su un numero di soggetti non elevato, sembrano indicare che i mannanoligosaccaridi possono essere utilizzati come valida alternativa agli antibiotici nei conigli nel periodo post-svezzamento. Il più favorevole indice di conversione alimentare ottenuto nei conigli alimentati con MOS potrebbe avere una doppia giustificazione. Da un lato, potrebbero essere attribuiti a cambiamenti morfologici della mucosa dell'ileo che in particolare Mourao et al. (2006) ben evidenziano in coniglietti alimentati con MOS. Tali cambiamenti consistono in un aumento nella lunghezza dei villi intestinali nonché in una maggiore profondità delle cripte. L'effetto positivo dei MOS sui villi intestinali potrebbe avere come conseguenza una migliore efficienza d'utilizzazione dei principi nutritivi che, a sua volta, è responsabile del miglioramento delle performance in vivo. Altra possibile spiegazione è legata all'interazione dei mannani con la microflora intestinale. Come precedentemente osservato i MOS sono in grado di interagire con la microflora batterica intestinale condizionandone verosimilmente la composizione e/o l'attività. Una diversa attività fermentativa dei batteri costituenti la microflora intestinale, in particolare del cieco, potrebbe determinare una diversa utilizzazione dei principi nutritivi della dieta.

Il fatto che tra i tre livelli di mannano-oligosaccaridi testati non siano emerse differenze statisticamente significative, e che gli indici di conversione alimentare siano risultati simili, sembrerebbe indicare che, nelle normali condizioni di allevamento intensivo, la dose di 0,5 g/kg di dieta di MOS è sufficiente a mantenere un adeguato stato sanitario dell'apparato digerente del coniglietto in accrescimento. Da questo punto di vista, i nostri risultati sono in linea con quanto riportato da Mourao et al. (2006) che osservarono un leggero (e non statisticamente significativo) incremento dell'indice di conversione alimentare con l'aumentare della concentrazione di mannani nella dieta da 1 a 2 g/kg.

4.2. Periodo di finissaggio (56 – 82 giorni)

Durante l'intera durata del periodo di finissaggio, il peso vivo (tabella 3) non ha fatto riscontrare differenze statisticamente significative tra i quattro gruppi. L'incremento ponderale giornaliero ha mostrato differenze significative tra i gruppi soltanto durante la prima settimana di prova, probabilmente a causa della risposta degli animali al cambiamento della dieta al sessantesimo giorno. In particolare, il gruppo MOS 1.0 ha mostrato un incremento di peso vivo giornaliero significativamente minore ($P < 0.05$) rispetto agli altri gruppi. In ogni caso, l'incremento ponderale giornaliero riferito all'intero periodo di finissaggio non ha fatto registrare differenze statisticamente significative tra i gruppi in prova

ed è risultato pari a 33.01; 32.73; 34.70; 33.27 g/d, rispettivamente per i gruppi MOS_0.5; MOS_1.0; MOS_1.5 e ANT.

Tabella 3 – Performance in vivo

giorni	Peso vivo				Incremento di peso vivo giornaliero		
	60	67	74	82	61-67	68-74	75-82
MOS 0.5	1705	1954	2156	2434	35.6a	28.8	34.8
MOS 1.0	1751	1963	2199	2473	30.2b	33.8	34.2
MOS 1.5	1703	1968	2191	2467	37.8a	31.8	34.5
ANT	1714	1971	2194	2443	36.8a	31.9	31.1
MSE	1650	1859	2432	3014	7.75	8.69	9.95

a, b: P<0.05; MSE: mean square error

Per quanto riguarda l'ingestione volontaria di alimento (tabella 4), il gruppo ANT e il gruppo MOS 0.5 hanno mostrato un'ingestione di alimento più elevata rispetto agli altri gruppi.

L'indice di conversione alimentare (tabella 4) è stato mediamente più favorevole per i gruppi MOS_1.5 e 1.0 (4.06 e 4.33) rispetto ai gruppi ANT e MOS_0.5 (4.56 e 4.58).

La mortalità è risultata mediamente pari al 3.46% e non ha fatto registrare differenze statisticamente significative tra i quattro gruppi.

Tabella 4 – Ingestione alimentare e indice di conversione alimentare

giorni	Ingestione alimentare (g/d)			Indice di conversione alimentare (ICA)		
	62-67	68-74	75-82	61-67	68-74	75-82
MOS_0.5	132.9	144.3	174.0	3.73	5.01	5.00
MOS_1.0	122.5	150.1	153.1	4.06	4.44	4.48
MOS_1.5	123.4	141.0	155.3	3.26	4.43	4.50
ANT	131.6	149.2	168.8	3.58	4.68	5.42

Il gruppo MOS_1.0 ha fatto riscontrare un'incidenza significativamente maggiore (P<0.05) del tratto gastrointestinale sul peso vivo rispetto ai gruppi MOS 0.5 e ANT (tabella 5) ed anche rispetto al gruppo MOS 1.5; in quest'ultimo caso però tale differenza non è risultata essere statisticamente significativa.

Tabella 5 – Peso vivo dei conigli e alcune caratteristiche della carcassa.

	PV g	Pelle %PV	TGIV %PV	CR g	RefC g	Testa %CRif	Fegato% CRif	Reni% CRif
MOS_0.5	2434	15.9	8.48b	1393	1120	12.3	8.54ab	1.45
MOS_1.0	2468	15.3	9.21a	1454	1165	11.1	9.43a	1.39
MOS_1.5	2461	15.9	8.83ab	1458	1183	11.4	7.87b	1.41
ANT	2451	16.0	8.49b	1395	1123	11.2	9.15a	1.25
MSE	3172	0.77	0.41	1249	1078	1.05	3.86	0.15

PV: peso vivo; TGIV: tratto gastrointestinale vuoto; CR: carcassa refrigerata; CRif: carcassa di riferimento; a, b: $P < 0.05$; MSE: mean square error

L'incidenza del fegato sulla carcassa di riferimento è risultata significativamente più elevata nei gruppi ANT e MOS 1.0 rispetto agli altri due gruppi.

La resa netta delle carcasse non ha fatto registrare differenze statisticamente significative all'interno dei gruppi (tabella 6). I conigli appartenenti al gruppo MOS 0.5 hanno mostrato valori più bassi, anche se non statisticamente significativi, per quanto riguarda la circonferenza della carcassa.

Per quanto concerne il grasso addominale, in accordo con quanto riscontrato da Fritts et al. (2003) nei tacchini, l'aggiunta di MOS, in particolare per i gruppi MOS 0.5 e 1.0 ha fatto riscontrare una diminuzione significativa e lineare della percentuale di grasso perirenale.

Tabella 6 – Caratteristiche della carcassa.

	RNM %	LC cm	CC cm	GP %CRif	GI % CRif	GIsp % CRif
MOS_0.5	65.5	37.8	18.5	0.83b	0.55	0.65
MOS_1.0	65.6	38.9	19.2	0.78b	0.71	0.59
MOS_1.5	66.1	38.6	19.3	0.97ab	0.61	0.61
ANT	65.7	38.1	19.0	1.13a	0.64	0.63
MSE	0.72	8.56	3.71	0.12	0.76	0.052

Resa netta di macellazione: RNM; LC: lunghezza della carcassa; CC: circonferenza della carcassa; GP: grasso perirenale; GI: grasso inguinale; GIsp: grasso interscapolare e; a, b: $P < 0.05$; MSE: mean square error.

L'elevata incidenza del tratto gastrointestinale nel gruppo MOS 1.0 non è stata accompagnata da una diminuzione significativa della resa netta di macellazione e questo potrebbe avvalorare l'ipotesi di un maggiore sviluppo dei villi intestinali. A tal proposito, Mourao et al. (2006) hanno osservato un incremento di altezza dei villi intestinali quando i MOS sono stati utilizzati in sostituzione agli antibiotici. Questo effetto positivo, sull'altezza dei villi può migliorare l'assimilazione dei nutrienti a livello intestinale il che può risultare anche in un miglioramento dell'indice di conversione alimentare. I gruppi MOS 1.0 e ANT hanno mostrato un ICA simile tra loro ad indicare un basso effetto di quantità minori di MOS nella dieta (0.5 g/kg) che non hanno fatto evidenziare miglioramenti della salute intestinale.

Se si prendono in considerazione i gruppi MOS 1.0 e 1.5 risulta più complesso giustificare la più alta incidenza del tratto gastrointestinale che si è verificata nel gruppo MOS 1.0 accompagnata inoltre da un più elevato ICA rispetto al gruppo MOS 1.5. Come parziale giustificazione di quanto detto sopra, si può prendere in considerazione il lavoro svolto da Mourau et al. (2006) in cui l'incremento di altezza dei villi intestinali verificatosi per i gruppi MOS 1 e 1.5 è accompagnato da un incremento dell'ICA che però non risulta essere statisticamente significativo.

5. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti sembrano indicare che i mannanoligosaccaridi possono rappresentare una valida alternativa agli antibiotici durante l'intero ciclo produttivo. Rispetto agli antibiotici, infatti, non hanno determinato significative modificazioni delle performance in vivo né delle caratteristiche delle carcasse. Non è stato possibile, per scelta aziendale effettuare un confronto con un gruppo alimentato senza antibiotici né MOS e sarebbe interessante poter effettuare un confronto anche in questo senso.

Relativamente al livello di MOS, i risultati della nostra prova suggeriscono che concentrazioni anche basse, pari a 0.5 g/kg di alimento siano efficaci nel garantire buone performance dei coniglietti.

6. BIBLIOGRAFIA

AOAC 2000. Official Methods of Analysis (17th Ed.). Assoc. Offic. Anal. Chem. Washington, DC.

Fonseca, A.P., Falcao, L., Kocher, A., Spring, P., (2004). Effect of dietary mannan oligosaccharide in comparison to oxitetracyclin on performance of growing rabbits. Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, C. Becerril and A. Pro (Eds.), Puebla, Mexico, 829-833.

Fritts, C.A., Waldroup, P.W., (2003). Evaluation of Bio-Mos® Mannan Oligosaccharide as a Replacement For Growth Promoting Antibiotics in Diets for Turkeys. Int. J. Poultry Sci., 2: 19-22.

Gidenne, T., (2000). Alimentacao do coelho em crescimento: resultados recentes. In: Jornadas Internacionais de Cunicultura. Vila Real, pp. 79–98.

Mourao, J.L., Pinheiro, V., Alves, A., Guedes, C.M., Pinto, L., Saavedra, M.J., Spring, P., Kocher, A., (2006). Effect of mannan oligosaccharides on the performance, intestinal morphology and cecal fermentation of fattening rabbits. Anim. Feed Sci. Technol., 126:107–120.

Pinheiro, V., Alves, A., Mourao, J.L., Guedes, C.M., Pinto, L., Spring, P., Koher, A., (2004). Effet of mannan oligosaccharides on the ileal morphometry and caecal fermentation of growing rabbits. Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, C. Becerril and A. Pro (Eds.), Puebla, Mexico, 936-941.

SAS Institute, (2000). SAS/STAT Users Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

CAPITOLO 3

INFLUENZA DEI MANNANOLIGOSACCARIDI SULLE CARATTERISTICHE DELLE CARCASSE E SULLA QUALITA' DELLE CARNI DI CONIGLIO

1. INTRODUZIONE

Il consumo di carne di coniglio è stato influenzato, come quello di altre carni, dall'evoluzione storica, economica e sociale. Tuttavia, siccome la produzione di carne di coniglio è fortemente sviluppata nelle città Mediterranee dell'UE, i suoi consumi dipendono in larga misura da ragioni culturali, tradizionali e religiose.

Per stimolare l'acquisto di carne di coniglio da parte dei non-consumatori bisogna prima di tutto puntare sull'educazione e sull'informazione riguardante questo tipo di carne e aumentarne la funzionalità (oggi quasi assente).

Per mantenere invece, costante la richiesta da parte dei consumatori abituali, un'attenzione particolare va rivolta allo stato sanitario della carne perché, anche se fino ad ora il consumatore della carne di coniglio non ha avuto dubbi sulla sua salubrità, oggi è pronto a cambiare le sue abitudini alimentari se la fiducia in tal senso decade, si veda infatti quanto è accaduto in seguito agli scandali alimentari che si sono verificati nell'ultimo decennio (BSE, influenza aviaria, diossina ecc).

Quindi, i principali criteri considerati dai consumatori, e su cui bisogna puntare per aumentare la domanda di carne di coniglio sono:

salubrità, proprietà sensoriali, qualità edonistica (variabilità sull'aspetto visivo), facilità e rapidità nella preparazione e prezzo.

Per quanto riguarda la salubrità è aumentata la sensibilità dei consumatori rispetto allo stato sanitario delle carni e all'impatto che i metodi moderni di produzione possono avere. Su queste ultime ci si riferisce in particolar modo alla presenza di:

- residui di farmaci nelle carni (Facchin *et al.*, 1996). come antibiotici o pesticidi usati per la produzione delle piante che vanno poi a comporre la razione degli animali;
- contaminanti, risultanti da una cattiva lavorazione delle carcasse (Zanon *e al.*, 1998) etc.

1.1. Qualità della carne

Come per altri animali, i prodotti ottenuti dal coniglio possono essere valutati considerando la qualità della carcassa e la qualità della carne.

La qualità della carcassa deve soddisfare obiettivi economici come la resa in carne vendibile e la convenienza per il consumatore. Tale qualità riguarda principalmente:

- il peso della carcassa (esso varia da 1,0 a 1,8 kg secondo le varie città europee o regioni considerate (Colin, 1999);

- la resa al macello riferita all'intera carcassa (pari a 55-61% del peso vivo; Ouhayoun, 1989; Dalle Zotte e Ouhayoun, 1998; Bielanski *et al.*, 2000; Milisits *et al.*, 2000);
- la resa dei tagli di vendita (Lombata: 23-28%, Ouhayoun, 1989; arti posteriori: 27-29% della carcassa a freddo, Parigi Bini *et al.*, 1992a);
- la carnosità, riferita al rapporto carne-ossa della carcassa di riferimento (7.0-8.0; Parigi Bini *et al.*, 1992a) o degli arti posteriori (4.2 – 6.0, Ouhayoun, 1989; Pla e Cervera, 1997; Dalle Zotte e Ouhayoun, 1998; Dal Bosco *et al.*, 2000);
- la grassezza, espressa come percentuale di grasso sezionabile (3-6% della carcassa di riferimento; Dalle Zotte e Ouhayoun, 1998);
- le perdite da raffreddamento (1,7-4 % della carcassa, Pla e Cervera, 1997; Dal Bosco *e al.*, 2000).

La definizione di qualità della carne varia e dipende dalle pratiche applicate durante la produzione ed ingloba una moltitudine di caratteristiche diverse:

- la qualità nutrizionale;
- la qualità tecnologica;
- la qualità organolettica;
- la qualità igienica.

Questa ultima in particolare si riferisce da un lato allo stato microbico, ovvero tipo e numero di microrganismi non patogeni e patogeni, dall'altro alla presenza di sostanze estranee quali residui di medicinali o altre sostanze in grado di alterare il gusto e l'odore della carne e del grasso nonché le condizioni della produzione animale in relazione al benessere animale e all'impatto della produzione animale sull'ambiente (Dalle Zotte, 2004).

2. OBIETTIVO DELLA RICERCA

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare, l'effetto dei mannanoligosaccaridi a differenti concentrazioni nella dieta (0.5, 1.0 e 1.5 g/kg di dieta), sulla qualità delle carcasse e delle carni di conigli in produzione zootecnica.

3. MATERIALE E METODI

3.1. Animali e management

Per la prova sono stati utilizzati 512 coniglietti di 60 giorni di età, appartenenti al tipo genetico ibrido Hyla, dal peso medio di 1718 g , omogeneamente divisi in 4 gruppi (128 conigli per gruppo) ed accasati tutti nello stesso capannone, in gabbie bicellulari dalle dimensioni 26×46×35 cm (2 conigli per gabbia, per un totale di 256 gabbie, 64 gabbie per gruppo). La prova è durata complessivamente 22 giorni, dall'inizio della fase di finissaggio, fino all'età di macellazione (82 giorni).

3.2. Diete

Tutti i gruppi in prova, hanno ricevuto la stessa dieta basale, rappresentata da un mangime del commercio normalmente utilizzato in azienda, formulato in modo da coprire i fabbisogni nutritivi degli animali in accordo con le indicazioni di Gidenne (2000). Gli ingredienti della dieta, in ordine decrescente di contenuto, erano rappresentati da: farina di erba medica disidratata, cruschetto, farina di girasole, fieno di erba medica, mais, melasso di canna da zucchero, farina di estrazione di soia tostata, carbonato di calcio, sale, olio di soia. La composizione chimica della dieta, espressa come percentuale della sostanza secca è riportata in tabella 1:

Tabella 1: composizione chimica della dieta

Sostanza secca	90.82
Ceneri	6.66
Proteine grezze	17.60
Lipidi grezzi	4.62
Fibra grezza	12.75
NDF	36.23
ADF	17.10
ADL	2.87
EL, Kcal/Kg s.s	4103.4

I quattro trattamenti alimentari applicati alla dieta basale sono di seguito descritti:

- 1) gruppo MOS_0.5, dieta contenente Bio-Mos® (Alltech, Inc., USA) alla concentrazione di 0,5 g/kg;
- 2) gruppo MOS_1.0, dieta contenente Bio-Mos® a 1,0 g/kg;
- 3) gruppo MOS_1.5. Dieta integrata con Bio-Mos® a 1,5 g/kg
- 4) gruppo ANT. Dieta integrata con antibiotico privo di tempi di sospensione (apramicina alla dose di 50 mg/kg) per evitare residui nelle carni. L'apramicina viene di consuetudine utilizzata nell'azienda in cui si è svolta la prova come profilassi per le diverse patologie che possono manifestarsi in allevamento.

Durante tutta la durata della prova, gli animali hanno avuto libero accesso sia agli alimenti che all'acqua.

3.3. Rilievi effettuati nel corso delle prove

La mortalità è stata registrata quotidianamente sull'intero gruppo fino all'età di macellazione. Il peso vivo individuale e l'ingestione di alimento per gabbia sono state rilevate ogni settimana su un totale di 32 gabbie per gruppo (64 conigli), al fine di calcolare l'incremento ponderale giornaliero e l'indice di conversione alimentare (ICA).

I coefficienti di digeribilità apparente di sostanza secca (SS), sostanza organica (SO), proteine grezze (PG), estratto etereo (EE), fibra grezza (FG), fibra resistente al detergente neutro (NDF), fibra resistente al detergente acido (ADF), cellulosa ed emicellulosa sono stati misurati utilizzando le ceneri acido insolubili (CAI) come marker inerte, come proposto da Vogtmann et al. (1975). Le feci sono state raccolte in tre giorni consecutivi (77 - 79 giorni di età) utilizzando delle reti di nylon piazzate sotto le gabbie. Trasportate in laboratorio, le feci fresche sono state essiccate in una stufa a ventilazione forzata a 60 °C fino a raggiungere un peso costante e quindi sottoposte ad analisi. Il calcolo dei coefficienti di digeribilità apparente è stato effettuato come segue:

digeribilità apparente (%) = $100 \times [(\% \text{ CAI nelle feci} / \% \text{ nutriente nelle feci}) - (\% \text{ CAI nell'alimento} / \% \text{ nutriente nell'alimento})] / (\% \text{ CAI nelle feci} / \% \text{ nutriente nelle feci})$.

A 82 giorni di età sono stati sacrificati 16 conigli per gruppo scelti in modo da ottenere animali omogenei tra i gruppi per peso e per sesso (rapporto maschi femmine 1:1). La macellazione è stata effettuata in un macello cunicolo specializzato, nel pieno rispetto delle norme relative al benessere animale.

Su tutte le carcasse, in accordo con le indicazioni di Blasco *et al.* (1992), sono stati effettuati i seguenti rilievi:

- apparato digerente pieno e vuoto (sgrondato),
- pelle,
- parti distali degli arti anteriori e posteriori e coda,
- tratto urogenitale con vescica vuota.

Le carcasse così ottenute sono state quindi pesate e messe a refrigerare a 4°C. Trascorse 24 ore, le carcasse sono state di nuovo pesate in modo da misurare le perdite d'acqua dovute alla refrigerazione e le seguenti parti anatomiche sono state separate e pesate:

- testa,
- fegato privato della cistifellea,
- corata (cuore, polmoni, esofago, trachea, ghiandola del timo,)
- reni privati del grasso perirenale.

Dopo l'asportazione del grasso di deposito (interscapolare e inguinale), le carcasse sono state nuovamente pesate ottenendo la cosiddetta carcassa di riferimento.

Dalla carcassa di riferimento (CR) sono stati inoltre separati l'estremità distale degli arti e il longissimus dorsi (LD). Sul Biceps femoris (BF) è stato misurato il pH dopo 24 ore dalla morte, con un pH metro portatile Hanna , modello HI 9025, equipaggiato con un elettrodo specifico per la carne FC 230C. L'arto sinistro è stato utilizzato per valutare la percentuale di carne (M), ossa (B) e grasso (F). Il rapporto carne ossa è stato calcolato in accordo con Parigi-Bini *et al.* (1992) come segue:

MB= (peso dell'arto posteriore intero-peso delle ossa)/peso delle ossa.

La carne ottenuta dallo spolpo dell'arto posteriore è stata macinata, essiccata ed utilizzata per determinare i contenuti di umidità, grasso e ceneri (AOAC, 1984). La percentuale di proteine è stata calcolata invece per differenza.

3.4. Analisi chimiche

3.4.1. Composizione chimica della dieta

La composizione chimica delle diete basali, comune a tutti i gruppi, e delle feci è stata effettuata in accordo con le seguenti metodiche proposte dall'A.O.A.C. (2000): sostanza secca, metodo numero 934.01; estratto etereo, metodo numero 920.39, ceneri 942.05, proteine grezze 954.01, fibra grezza 945.18; fibra resistente al detergente acido, lignina resistente al

detergente acido, metodo numero 973.18; fibra resistente al detergente neutro trattata con alfa amilasi, metodo numero 2002.04.

3.4.2. Determinazione del collagene e della sua solubilità

Per la determinazione del collagene e della sua solubilità sono stati omogeneizzati 5 grammi di campione in 10 ml di NaCl 0.9% e messi successivamente a bagnomaria per 2 ore a 80°C. Si è poi proceduto alla centrifugazione per separare la fase solubile da quella insolubile secondo il metodo proposto da Sorensen (1981).

Ogni frazione è stata idrolizzata in HCl per 16 ore a 96°C. Il contenuto di idrossiprolina nella fase solubile e insolubile è stato determinato secondo la metodica descritta da Hutson P.R. et al (J. Chromatogr. B. 791, 427-430, 2003). L'idrossiprolina contenuta in ogni frazione è stata convertita, rispettivamente, in collagene solubile e insolubile usando 7.5 come fattore di conversione. La percentuale di solubilità è stata quindi calcolata dividendo il collagene solubile (supernatante) per la somma del collagene solubile e insolubile moltiplicando per 100.

3.4.3. Determinazione del colore

La determinazione strumentale del colore è stata effettuata, secondo il sistema Lab (L*=lightness; a*= redness e b*= yellowness), con colorimetro Minolta CR-300®(Minolta Camera Co., Osaka, Japan, illuminant D65 and 0° observer).

I parametri colorimetrici sono stati rilevati 24 ore dopo la morte degli animali, su campioni derivati dalla dissezione della CR, ed in particolare su una parte del Biceps femoris (BF) prelevata approssimativamente nella porzione centrale del muscolo.

Sulla superficie di ogni campione sono state eseguite tre misurazioni ruotando il sistema rilevatore di 90° rispetto alla posizione precedente.

Ai fini statistici è stato considerato il valore ottenuto dalla media delle tre misurazioni. Le coordinate dello standard impiegato sono state: L* = 64.5, a* = 1.0, b* = 1.9.

Le coordinate a* e b* sono state utilizzate per la determinazione di:

- croma = $(a^2 + b^2)^{1/2}$

- h (angolo di tinta) = $\tan^{-1}(b/a)$

come indicato da Mancini, Hunt, Hachmeister, Kropf, e Johnson (2004) e Little (1975).

3.4.4. Determinazione della WBSF e della Resistenza:

Da ogni campione di carne, ottenuto dal BF, sono stati prelevati 3 tasselli cilindrici di diametro pari ad 1 cm mediante un carotatore. I tasselli sono stati sottoposti ad analisi reologica mediante apparecchiatura corredata del dispositivo per il test del Warner Bratzler Shear Force (WBSF) ovvero l'Instron 1140 (Instron, High Wycombe, U.K.)

La registrazione dello sforzo compiuto dalla lama per tagliare il campione viene riportato su di un grafico bidimensionale carico-spostamento dando luogo al tipico tracciato tissuometrico. Da tale curva, tramite opportuni calcoli, si ottengono durezza e resistenza. Lo stesso è stato fatto su porzioni di campione cotti a bagnomaria ad 80°C per 40'.

3.4.5. Composizione acidica del grasso estratto dalle carni

Il grasso è stato estratto dalle carni con una miscela di cloroformio-metanolo (2:1 v/v) secondo quanto previsto dal metodo di Folch *et al.* (1957).

La determinazione della composizione acidica della carne è stata effettuata tramite gas cromatografia, previa preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi in accordo con Christie *et al.* (2001).

Il gas cromatografo (CE 8000 Top, Thermoquest, Milan, Italy) era dotato di una colonna capillare della Supelco(OMEGAWAX 250 capillary fused silica, 30m, 0.25mm, 0.25µm film thickness), le condizioni di analisi sono state le seguenti: temperatura di analisi 200°C; iniettore 250°C; temperatura detector a fiamma ionica, 250°C; gas carrier idrogeno, 1.6 ml/min.

Il riconoscimento dei singoli acidi grassi è avvenuto rapportando i singoli tempi di ritenzione a quelli del mix di standard noti (Mix C4-24, 18919- 1 AMP, Supelco, Bellafonte, PA, USA).

4. ANALISI STATISTICA

Le differenze tra i gruppi relativamente alle performance in vivo, ai coefficienti di digeribilità apparente dei nutrienti e alle caratteristiche delle carcasse sono state valutate tramite analisi della varianza (SAS, 2000) ad una via, testando l'effetto degli antibiotici o dei diversi livelli di MOS.

Le differenze tra le medie sono state valutate attraverso il Tukey test.

Le differenze tra le percentuali di mortalità sono state confrontate mediante test Chi-quadro.

5. RISULTATI E DISCUSSIONI

Durante le tre settimane di sperimentazione, l'incremento di peso vivo giornaliero (tabella 2), ha avuto un andamento variabile in tutti i gruppi in prova. Questi risultati sono in linea con quelli segnalati da altri autori (Fonseca *et al.*, 2004; Pinheiro *et al.*, 2004; Mourao *et al.*, 2006) e dimostrerebbero un'azione non chiara dei MOS sull'accrescimento.

Se si prende però in considerazione l'intero periodo di ingrasso (60-82 giorni), si può notare come il gruppo MOS 1.5 abbia presentato un incremento ponderale giornaliero significativamente più elevato rispetto agli altri tre gruppi. Questo comportamento fa ipotizzare che l'azione dei MOS sull'accrescimento si manifesta soltanto ad una certa concentrazione di questi ultimi nelle diete. A conferma di quanto detto anche Staykov *et al.* (2007) hanno segnalato differenze statisticamente significative nella trota soltanto con l'aggiunta di MOS nella dieta ad una concentrazione dello 0,2%.

Tabella 2: Incremento ponderale giornaliero g/d

Giorni	ANT	MOS 0.5	MOS 1.0	MOS 1.5	SEM
60 - 66	36.8 ^{AB}	35.6 ^B	30.2 ^C	37.8 ^A	0.45
67 - 73	31.9 ^{Ab}	28.8 ^{Bc}	33.8 ^{Aa}	31.8 ^{Ab}	0.49
74 - 82	31.1 ^B	34.8 ^A	34.2 ^A	34.5 ^A	0.48
60 - 82	33.3 ^B	33.1 ^B	32.7 ^B	34.7 ^A	0.27

SEM: media dell'errore standard; A, B, C: P < 0.01; a, b: P < 0.05

Per quanto riguarda l'ingestione di alimento giornaliera (tabella 3) i gruppi ANT e MOS 0.5 hanno mostrato valori più elevati rispetto ai gruppi MOS 1.0 e 1.5, i quali, durante tutto il periodo di prova (60-82 giorni) hanno fatto registrare un'ingestione giornaliera significativamente più bassa rispetto agli altri due gruppi. Questi risultati trovano conferma in quelli riportati da Di Meo *et al.* (2009) in cui si è osservata una minore ingestione in conigli dopo lo svezzamento alimentati con diete supplementate da MOS.

Tabella 3: Ingestione di alimento giornaliera g/d

Giorni	ANT	MOS 0.5	MOS 1.0	MOS 1.5	SEM
60 - 66	131.6 ^A	132.9 ^A	122.5 ^B	123.4 ^B	1.29
67 - 73	149.2 ^A	144.3 ^{AB}	150.1 ^A	141.0 ^B	1.33
74 - 82	168.8 ^A	174.0 ^A	153.1 ^B	154.3 ^B	1.40
60 - 82	149.9 ^A	150.4 ^A	141.9 ^B	139.6 ^B	0.75

SEM: standard error of mean; A, B, C: P < 0.01; a, b: P < 0.05

L'indice di conversione alimentare (tabella 4) è risultato essere generalmente più elevato nei gruppi ANT e MOS 0.5. Nell'intero periodo della sperimentazione, il gruppo MOS 1.5 ha mostrato un ICA significativamente (P<0.01) più basso rispetto agli altri tre gruppi.

Tabella 4: Indice di conversione alimentare g/g

Giorni	ANT	MOS_0.5	MOS_1.0	MOS_1.5	SEM
60 - 66	3.58 ^B	3.75 ^B	4.10 ^A	3.28 ^C	0.06
67 - 73	4.70 ^{AB}	5.04 ^A	4.50 ^B	4.46 ^B	0.08
74 - 82	5.46 ^A	5.02 ^B	4.51 ^C	4.50 ^C	0.07
60 - 82	4.51 ^{AB}	4.55 ^A	4.35 ^B	4.03 ^C	0.04

SEM: standard error of mean; A, B, C: P < 0.01; a, b: P < 0.05

Il più favorevole indice di conversione alimentare ottenuto nei conigli alimentati con MOS alla concentrazione più alta potrebbe essere giustificato dai cambiamenti morfologici della mucosa dell'ileo (Mourao *et al.*, 2006) indotti da questi ultimi che in particolare consistono in un aumento nella lunghezza dei villi intestinali nonché in una maggiore profondità delle cripte. Il miglioramento del quadro istologico dell'apparato digerente potrebbe essere responsabile della migliore digeribilità dei nutrienti (tabella 5), significativamente più elevata per quasi tutti i parametri, nel gruppo MOS_1.5 rispetto al gruppo alimentato con antibiotici.

Tabella 5. Coefficienti di digeribilità apparente (%) dei nutrienti

	ANT	MOS 0.5	MOS 1.0	MOS 1.5	SEM
SSd	68.82b	71.68ab	70.80ab	75.04a	1.27
SOd	69.39B	72.61AB	71.74AB	75.95A	1.23
PGd	81.62B	86.55AB	84.94AB	87.23A	1.00
EEd	91.64	90.92	90.91	92.79	1.01
FGd	25.73B	35.52AB	36.34AB	45.86A	2.84
NDFd	43.45B	49.57AB	47.28AB	54.28A	2.24
ADFd	21.22Bb	34.88Aa	32.74ABa	41.40Aa	2.36
CELLd	28.31Bc	38.24ABab	34.27ABbc	45.48Aa	2.11
EMICELLd	56.76B	63.08AB	62.12AB	68.07A	2.03

Tuttavia, l'aumento della digeribilità della sostanza secca e della sostanza organica è da imputare principalmente all'aumento della digeribilità delle frazioni fibrose, in particolare alla cellulosa la cui digeribilità nei conigli del gruppo MOS_1.5 è quasi il doppio rispetto ai conigli del gruppo ANT. Come è noto, la digestione dei costituenti della parete cellulare nel coniglio si realizza nel grosso intestino e, più precisamente, nel cieco ad opera della flora batterica ivi residente capace di fermentare i carboidrati di struttura e fornendo, come prodotti finali, gli acidi acetico, butirrico e propionico che vengono poi utilizzati dall'animale anche per fini energetici. Da queste considerazioni scaturisce che l'aumento della digeribilità dei carboidrati di struttura, più che da un aumento della superficie deputata all'assorbimento nel canale digerente, potrebbe essere da ascrivere all'effetto dei MOS sulla popolazione batterica, sia nel senso di condizionarne la composizione sia l'attività fermentativa. Bovera *et al.* (2010), studiando le fermentazioni del cieco di conigli alimentati con diversi livelli di MOS vs. antibiotici *in vitro*, hanno osservato che diete con 1 g di mannanoligosaccaridi per kg inducono miglioramenti delle fermentazioni ciecali, aumentano la digeribilità della sostanza organica e di conseguenza l'utilizzazione dei principi nutritivi della dieta. D'altra parte, anche l'aumento della digeribilità delle proteine potrebbe essere da imputare ad un miglioramento delle sintesi batteriche con maggiore incorporazione di azoto nelle cellule batteriche, azoto che viene poi utilizzato dagli animali attraverso il fenomeno della ciecotrofia. Un'ulteriore conferma è rappresentata dal fatto che non sono state registrate differenze statisticamente significative nella digeribilità dei lipidi contenuti nella dieta. Infatti, le sostanze lipidiche che sfuggono all'assorbimento nell'intestino tenue non vengono fermentati dalla microflora intestinale, ma soltanto idrogenati da essa (Fernandez *et al.*, 1994; Gidenne, 1996), non venendo così ad essere modificata la quantità di lipidi effettivamente utilizzati dall'animale.

Come riportato in tabella 6, il peso vivo all'età di macellazione così come la maggior parte dei rilievi effettuati sulla carcassa, non hanno mostrato differenze significative tra i gruppi alimentati a differenti concentrazioni di MOS e il gruppo di controllo. Questi risultati sembrerebbero indicare che l'utilizzazione dei MOS non comporta modificazioni rilevanti sui parametri relativi alla macellazione e alla sezionatura della carcassa.

Il gruppo MOS 1.5 ha però fatto registrare la percentuale significativamente più alta ($P < 0.05$) di peso del tratto gastrointestinale vuoto rispetto al peso vivo, ma la più bassa incidenza di grasso perirenale rispetto alla carcassa di riferimento ($P < 0.05$). L'aumento dell'incidenza percentuale dell'apparato digerente svuotato e sgrondato sul peso vivo è stato segnalato anche da Piccolo *et al.* (2009) ed in realtà, più che ad un reale aumento di peso dell'apparato digerente dovuto ai MOS è da ascrivere ad un effetto negativo degli antibiotici che determinano una riduzione della massa enterica (muscolare > mucosa), mentre i MOS non hanno effetti sulla massa enterica anche se possono determinare un aumento dello strato muscolare del lume intestinale per un aumento dell'attività peristaltica (Ferket *et al.*, 2002).

A parziale conferma di quanto affermato si segnala che Grisdale-Helland *et al.* (2008) riportano un contenuto inferiore di lipidi nelle carni di salmoni alimentati con diete contenenti MOS.

Tabella 6 – Rilievi alla macellazione e alla sezionatura

	ANT	MOS_0.5	MOS_1.0	MOS_1.5	SEM
PV, g	2376.7	2393.9	2467.6	2460.7	70.12
Pelle, % PV	15.96	15.76	15.31	15.86	0.31
DV, % PV	8.49 ^b	8.48 ^b	8.33 ^b	9.21 ^a	0.09
CRef, g	1395.4	1393.2	1453.9	1458.3	45.72
RCL, %	58.77	58.07	58.94	59.26	0.30
RCN, %	65.72	65.50	64.59	66.54	0.30
CR, g	1122.8	1120.4	1165.3	1182.5	39.82
testa, % CR	11.22	12.33	11.13	11.39	0.36
Fegato, % CR	9.15	8.54	9.43	7.87	0.68
Rene, % CR	1.25	1.45	1.39	1.42	0.08
Cuore, % CR	2.37	2.35	2.42	2.37	0.11
LC, cm	38.14	36.10	38.89	38.57	1.01
CC, cm	19.00	18.50	19.22	19.29	0.67
GP, % CR	1.74 ^a	1.65 ^a	1.71 ^a	1.21 ^b	0.03
GI, % CR	0.50	0.50	0.51	0.35	0.10
GS, % CR	1.33	0.83	0.52	1.10	0.25

PV: peso vivo; DV: digerente vuoto; CRef: carcassa refrigerata; RCL:resa lorda a caldo; RCN: resa a caldo netta; CR: carcassa di riferimento; LC:lunghezza della carcassa; CC: circonferenza della carcassa; GP: grasso perirenale; GI: grasso inguinale; GS: grasso scapolare. a, b: P < 0.05; SEM: standard error of mean

Di seguito sono riportati in tabella 7 i parametri colorimetrici rilevati sulla carcassa, e come si può notare, l'indice del rosso (a) e del giallo (b) non hanno fatto riscontrare differenze significative fra i vari gruppi in prova, cosa che si è verificata invece per quanto riguarda la luminosità (L) che è risultata essere significativamente più elevata nel gruppo di carcasse di animali alimentati con la concentrazione di MOS 0.5.

Il gruppo MOS 0.5 e quello 1.0 hanno inoltre fatto evidenziare una percentuale di ossa nell'arto posteriore sinistro, significativamente più elevata rispetto agli altri due gruppi, che ha comportato quindi, un valore inferiore nel rapporto ossa/carne rispetto ai gruppi MOS1.5 e ANT.

Il test di Warner Bratzeler Shear Force (WBSF) effettuato per determinare la valutazione dei parametri reologici al taglio, ha fatto registrare valori significativamente più elevati nei gruppi MOS 0.5 e MOS 1.0 rispetto agli altri due.

Per quanto riguarda il contenuto in collagene e la solubilità di quest'ultimo, non si sono avute differenze tra i vari gruppi testati, fatta eccezione per il gruppo ANT che ha mostrato il più basso ($P < 0.05$) livello di collagene.

Tabella 7 Parametri colorimetrici e reologici delle carni

	ANT	MOS 0.5	MOS 1.0	MOS 1.5	SEM
L*	49.91	53.67	50.49	49.30	1.87
a*	4.32	4.90	4.64	4.37	0.34
b*	2.11	2.35	2.52	1.75	0.56
C* (Croma)	4.86	4.99	4.85	4.55	0.78
h* (a. di tinta)	26.15	25.67	28.54	21.75	1.97
pH	5.84	5.84	5.76	5.82	0.03
APS, g	136.0	147.6	140.9	146.6	6.13
Osso, % APS	17.59 ^b	18.32 ^{ab}	21.01 ^a	18.06 ^{ab}	0.84
Carne, % APS	80.62	80.01	77.29	80.16	0.87
Grasso, %APS	1.77	1.67	1.70	1.77	0.22
C/O	4.60 ^a	4.47 ^{ab}	3.76 ^b	4.50 ^{ab}	0.21
WBSF (Kg)	0.46 ^b	0.65 ^a	0.68 ^a	0.43 ^b	0.04
Collagene,mg/g	7.72	9.47	9.73	9.07	0.63
Coll Sol, %	27.32	29.57	27.89	28.53	0.75

APS: arto posteriore sinistra; C/O: rapporto carne ossa; Coll Sol: collagene solubile; WBSF: test del Warner Bratzler Shear Force

I trattamenti nutrizionali con i MOS, non hanno mostrato avere un effetto significativo sulla composizione chimica della carne, come si può vedere dai dati riportati in tabella 8. Solo la perdita per congelamento è stata significativamente ($P < 0.05$) meno importante per il gruppo alimentato con Mos 1.5 rispetto agli altri. Questo comportamento, se confermato in altre ricerche, potrebbe essere di grande utilità ai fini della conservazione delle carcasse e delle carni.

Tabella 8. Composizione chimica della carne.

%	ANT	MOS 0.5	MOS 1.0	MOS 1.5	SEM
PC	2.29 ^a	1.91 ^a	1.99 ^a	1.54 ^b	0.17
Umidità	72.69	72.86	72.58	72.18	0.54
Proteine	22.50	22.33	22.59	22.93	0.46
Grassi,	3.63	3.61	3.65	3.70	0.07
Ceneri,	1.17	1.19	1.18	1.19	0.02

PC: perdite per congelamento

In tabella 9 si riporta la composizione acidica del grasso rilevata nei quattro gruppi in prova. In particolare, i gruppi MOS_1.0 e 1.5 hanno fatto registrare una significativa riduzione ($P < 0.05$) del contenuto di acido palmitico. Il gruppo ANT ha mostrato inoltre il contenuto più elevato ($P < 0.05$) di acido stearico, seguito dal gruppo MOS_0.5 e, insieme, dai gruppi MOS_1.0 e 1.5. I gruppi MOS_1.0 e 1.5 hanno anche presentato una più elevata ($P < 0.05$) percentuale di acido oleico rispetto agli altri due gruppi. Infine, il gruppo ANT ha presentato la più alta percentuale ($P < 0.01$) di acidi grassi saturi mentre i gruppi MOS_1.0 e 1.5 hanno fatto registrare una proporzione più elevata di acidi grassi monoinsaturi rispetto al gruppo ANT. In ogni caso, la percentuale di acidi grassi poliinsaturi non è stata influenzata dai diversi trattamenti alimentari. Nel coniglio, gli acidi grassi endogeni che sono sintetizzati a partire dai carboidrati, sono principalmente il palmitico (C 16:0), l'oleico (C 18:1) e lo stearico (C 18:0) (Ouhayoun *et al.*, 1985, 1987). Gli acidi grassi poliinsaturi, invece, non sono sintetizzati dall'organismo ma vengono assorbiti direttamente dalla dieta e incorporati nei tessuti adiposi subendo, quindi, in maniera notevole l'influenza della composizione lipidica della dieta (Ouhayoun, 1998). Da questo scaturisce che, avendo come base la stessa dieta, le differenze riscontrate nella composizione acidica dei grassi e, in particolare, degli acidi grassi endogeni (palmitico, oleico e stearico) devono essere imputate a diversi meccanismi di saturazione e/o desaturazione degli acidi grassi. Nella nostra prova, I MOS sembrano capaci di ridurre le quantità di acido palmitico e stearico e di aumentare la quantità di acido oleico, determinando quindi una riduzione del grado di saturazione dei lipidi. In accordo con Furuse *et al.* (1992), la composizione acidica dei grassi degli alimenti e dei tessuti animali possono essere modificati come risultato dell'azione della flora batterica del grosso intestino, poichè tali microrganismi sono in grado di idrogenare gli acidi organici insaturi determinandone una maggiore saturazione, o anche di denaturare alcuni acidi organici. La nostra ipotesi è che l'effetto dei mannanoligosaccaridi sulla microflora del grosso intestino possa determinare una selezione di

batteri con differenti abilità in termini di idrogenazione, rispetto ai batteri selezionati dalla dieta contenente antibiotici. Anche Bonos *et al.* (2010) trovarono un contenuto di acido palmitico significativamente più basso in quaglie alimentate con MOS a 1 g/kg di dieta e Rekiel *et al.* (2005) riscontrarono una concentrazione significativamente più elevata di acido oleico in suini alimentati con mannanoligosaccaridi. Una modificazione in tal senso del contenuto in acidi grassi dei tessuti adiposi, può avere un risvolto positivo per la salute del consumatore se si considera che gli acidi grassi saturi sono quelli considerati avere effetti negativi sulle funzioni cardiocircolatorie. D'altra parte, non essendoci sostanzialmente modifiche nel contenuto di acidi grassi poliinsaturi, non vengono invece ad essere modificate le proprietà tecnologiche del grasso intese nel senso di resistenza ai trattamenti termici e all'esposizione alla luce.

A proposito della concentrazione ottimale di MOS da utilizzare, nella nostra prova i risultati migliori sono stati ottenuti con 1.5 g/kg di alimento. Infatti, sia le performance in vivo (incremento ponderale giornaliero, indice di conversione alimentare), sia la qualità dei lipidi è stata influenzata positivamente. Questo risultato è interessante se si considera che in nostre precedenti prove condotte su conigli in accrescimento (35 – 60 giorni di età) la concentrazione di MOS che ha fornito i risultati più soddisfacenti è stata quella di 1 g/kg di alimento.

Tabella 9. Composizione acidica del grasso.

	ANT	MOS 0.5	MOS 1.0	MOS 1.5	SEM
Laurico 12:0	1.58	1.34	1.50	1.50	0.11
Miristica 14:0	5.21	4.67	4.91	4.79	0.20
Palmitico 16:0	30.78 ^a	28.11 ^{ab}	27.19 ^b	27.80 ^b	0.52
Stearico 18:0	0.87 ^a	0.78 ^b	0.67 ^c	0.67 ^c	0.03
SFA	38.44A	34.90B	34.27B	34.67B	0.42
Miristoleico 14:1	0.55	0.63	0.54	0.53	0.09
Palmitoleico 16:1	6.39	5.91	5.47	5.84	0.23
Oleico 18:1	27.44 ^b	29.43 ^b	31.46 ^a	30.73 ^a	0.59
MUFA	34.38B	35.97AB	37.47A	37.10A	0.39
Linoleico 18:2	23.62	25.67	24.70	24.80	1.05
γLinoleico 18:3	0.76	0.81	0.73	0.72	0.10
αLinoleico 18:3	0.36	0.36	0.43	0.42	0.09
Arachidonico 20:4	0.59	0.62	0.60	0.53	0.08
C20:5ω3	0.42	0.37	0.42	0.38	0.05
C22:5ω3	0.98	0.95	1.01	0.95	0.08
C22:6ω3	0.45	0.35	0.37	0.43	0.04
PUFA	27.18	29.13	28.26	28.23	0.93

6. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti sembrano indicare che i mannanoligosaccaridi possono rappresentare una alternativa valida agli antibiotici come promotori della crescita nell'alimentazione del coniglio durante la fase di finissaggio. Infatti, ai miglioramenti registrati per alcuni parametri in vita (principalmente accrescimento e l'indice di conversione alimentare), è da segnalare anche una migliore composizione acidica delle carni che presentano un minor contenuto di acidi grassi saturi. Da non sottovalutare, infine, che l'aggiunta dei MOS alla dieta non modifica i parametri rilevati alla macellazione e alla sezionatura delle carcasse e la composizione chimica delle carni.

7. BIBLIOGRAFIA

A.O.A.C. (2000). Official Methods of Analysis (17th Ed.). Assoc. Offic. Anal. Chem. Washington, DC.

Bonos E.M., Christaki E.V. and Florou-Paneri P.C. Performance and carcass characteristics of Japanese quail as affected by sex or mannan oligosaccharides and calcium propionate South African Journal of Animal Science 2010, 40 (3): 173-184

Bovera F., Marono S., Di Meo C., Piccolo G., Iannaccone F., Nizza A. (2010) - Effect of a mannan oligosaccharides supplementation on caecal microbial activity of rabbits. Animal doi 10.1017/S1751731110000558.

Cervera, C., Blas, E., Fernandez-Carmona, J., (1997). Growth of rabbits under different environmental temperatures using high fat diets. World Rabbit Sci. 5 (2), 71-75.

Colin, M., (1999). La cuniculture européenne. Cuniculture 150 (26(6)), 299-301.

Dal Bosco, A., Castellini, C., Bernardini, M., 2000. Productive performance and carcass meat characteristics of cage- or penraised rabbits. In: Proceedings of the 7th World Rabbit Congress, Valencia, Spain, 4-7 July, pp. 579-583.

Di Meo C., Bovera F., Piccolo G., Nizza S., Vella N., Nizza A. (2009). Impiego dei mannano-oligosaccaridi come alternativa agli antibiotici nel coniglio: effetti sulle performance in vivo. Giornate di Coniglicoltura ASIC, 52-54.

Facchin, E., Zanon, F., Fioretti, A., Gallazzi, D., (1996). Monitoring on rabbit meat production chain. In: Proceeding of the 6th World Rabbit Congress, Toulouse, France. 3, pp.67-72.

Fernandez F., Hinton, M. and Van Gils, B. (2002). Dietary mannan-oligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella enteritidis* colonization. *Avian Pathology* 31: 49-58.

Ferket P. R., Parks C. W., and Grimes J. L. Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. Multi-State Poultry Meeting May 14-16, 2002

Fonseca A.P., Falcao L., Kocher A., Spring P. (2004). Effect of dietary mannan oligosaccharide in comparison to oxitetracyclin on performance of growing rabbits. Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, C. Becerril and A. Pro (Eds.), Puebla, Mexico, 829-833.

Furuse, M., Murai, A. & Okumura, J., (1992). Gut microflora can modify fatty acid composition in liver and egg yolk lipids of laying Japanese quail. *Comp. Biochem. Physiol.* 103A, 569-571.

Grisdale-Helland B., Helland S.J., Gatlin D. M. (2008) The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 163-167.

Milisits, G., Romvári, R., Szendrő, Z.s., Masoero, G., Bergoglio, G., (2000). The effect of age and weight on slaughter traits and meat composition of Pannon White growing rabbits. In: Proceedings of the 7th World Rabbit Congress, Valencia, Spain, 4-7 July, pp. 629-636.

Mourao J.L., Pinheiro V., Alves A., Guedes C.M., Pinto L., Saavedra M.J., Spring P., Kocher A. (2006). Effect of mannan oligosaccharides on the performance, intestinal morphology and caecal fermentation of fattening rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:107–120.

Ouhayoun, J., (1989). La composition corporelle du lapin. INRA Prod. Anim. 2 (3), 215-226.

Ouhayoun. J., Delmas, D., Poujardieu, B.,(1998). La viande de lapin. Effet des conditions de refrigeration et de conservation des carcasses sur le pH musculaire et les pertes de poids. Viandes Prod Carnés 10, 87-89.

Parigi Bini, R., Xiccato, G., Cinetto, M, Dalle Zotte, A., (1992°). Effetto dell'età e peso di macellazione e del sesso sulla qualità della carcassa e della carne cunicola. 1. Rilievi di macellazione e qualità della carcassa. Zoot. Nutr. Anim. 18, 157-172.

Pla, M., Cervera, C., (1997). Carcass and meat quality of rabbits given diets having a high level of vegetable or animal fat. Anim. Sci. 65, 299-303.

Rekiel A., Wiecek J., Dziuba M. (2005)Effect of feed additives on the results of fattening and selected slaughter and quality traits of pork meat of pigs with different genotypes Czech J. Anim. Sci., 50, (12): 561–567

SAS/STAT Users Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Schlolaut, W., Lange, K. (1973). Der Einfluss von Methionin auf die Mastleitung und den Woolertrag von Kaninchen. Archiv Für Geflügelkunde 37, 208.

Staykov Y. Spring P. Denev S. Sweetman J. (2007) Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquacult Int 15:153–161.

Zanon, F., Facchin, E., Chiavegato, M.G., Rossi, I., Rozzo, A., Rasetti, M., Conte, L., (1998). Biosécurité de la filière cunicole: proposition d'un programme de contrôle pour les abattoirs. In: Proceeding of the 7èmes Journées Recherche Cunicole, Lyon, France, pp. 85-88.

CAPITOLO 4

EFFETTO DEI MANNANOLIGOSACCARIDI SULLE PERFORMANCE DI ACCRESCIMENTO E SULLA POPOLAZIONE BATTERICA ANAEROBICA FECALE DI CONIGLI DURANTE UN EPISODIO DI ENTEROPATIA ENZOOTICA

1. INTRODUZIONE

Il periodo intorno allo svezzamento, come già ampiamente descritto, risulta essere molto delicato per il coniglio, specialmente nelle forme di allevamento intensivo dove il vuoto sanitario spesso non viene praticato per esigenze commerciali e il livello di contaminazione batterica ambientale sale a livelli piuttosto alti.

Nel nostro caso in particolare, durante la prova si è verificato un episodio di Enterocolite Enzootica del Coniglio (EEC).

Al momento attuale, le malattie infettive del sistema digerente rappresentano circa il 70% del totale delle malattie che colpiscono il coniglio. Questa percentuale, da sempre elevata, è aumentata negli ultimi anni a seguito della comparsa dell'Enterocolite Enzootica del Coniglio.

L'apparizione di questa particolare forma enterica in Europa, risale agli inizi del 1997; in poco tempo si è ampiamente diffusa e oggi rappresenta la prima causa di mortalità nell'allevamento del coniglio (Dewree et al., 2003). Negli allevamenti commerciali dell'Unione Europea, la EEC può infatti provocare fino al 60% di mortalità e un aumento della morbilità tale da ritardare il raggiungimento del peso per dare inizio alla fase di finissaggio anche di 1 - 2 settimane (Carabaño et al, 2005).

L'enterocolite enzootica può essere descritta anche come una forma grave di enteropatia mucoide, complicata da agenti eziologici secondari che rendono spesso il quadro clinico e anatomo-patologico difficilmente interpretabile. Ha un'eziologia sconosciuta, di tipo multifattoriale e gli agenti identificati come concorrenti alla comparsa della malattia sono riferibili a cause infettive, batteriche, alimentari, all'utilizzo scorretto di antibiotici e a cause ambientali. Si considerano come valide tutte queste ipotesi, non avendo ancora identificato in maniera certa l'agente responsabile della malattia (Licois et al., 2000; Marlier et al., 2006; Szalo et al., 2007).

Il periodo di latenza può variare da un minimo di due giorni ad una o due settimane in cui l'animale reagisce alla patologia. Nel caso in cui il decorso si prolunghi, l'animale può andare incontro ad una remissione della sintomatologia, rimanendo però estremamente debilitato e suscettibile a nuove infezioni. I primi sintomi osservabili alla comparsa della malattia sono una drastica riduzione dell'assunzione di alimento e di acqua, che conduce a un veloce deperimento dell'animale e alla sua disidratazione. Successivamente, possono comparire diarrea molto liquida e muco fluido, filante e generalmente trasparente. La diarrea e il muco

non sono presenti qualora la malattia si presenti con un decorso iperacuto. In questo caso, l'animale (generalmente di età compresa tra la 7^a e 8^a settimana) giunge a morte in due giorni e presenta solo una grave costipazione a livello ciecale e, a volte, un forte gonfiore addominale.

Lo stomaco e il cieco sono dilatati, provocando il blocco del piloro. Il contenuto dello stomaco può essere liquido o in alternativa estremamente compatto e il suo pH in corso di malattia è decisamente più acido (Pérez de Rozas et al., 2005). In generale l'assenza di lesioni infiammatorie a carico della parete del cieco, permettono di differenziare l'enterocolite dalle altre forme enteriche che normalmente colpiscono il coniglio (coccidiosi intestinale, colibacillosi, klebsiellosi ecc.).

2. OBIETTIVO DELLA RICERCA

Scopo della ricerca è stato quello di valutare l'effetto di diete additivate con mannanoligosaccaridi a diversi livelli (0,5, 1,0 e 1,5 g / kg di dieta) sulle performance in vivo, sulla digeribilità dei nutrienti e sulla popolazione batterica anaerobica fecale di conigli in fase di accrescimento (35 - 60 giorni), durante un episodio di Enterocolite Enzootica del Coniglio.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Animali e management

La prova è stata condotta su un totale di 3420 conigli del tipo genetico ibrido Hyla dell'età di 35 giorni. Gli animali sono stati divisi in 5 gruppi omogenei per peso e sesso (684 animali/gruppo) ed accasati, in gabbie bicellulari (26×46×35 h cm, 2 conigli/gabbia, 342 gabbie/gruppo) all'interno dello stesso capannone per far sì che le condizioni ambientali fossero uguali per tutti gli animali in prova.

La prova è durata complessivamente 25 giorni (35° - 60° giorno).

3.2. Rilievi effettuati nel corso delle prove

La mortalità è stata registrata quotidianamente fino al termine della prova (60 giorni di età).

Il peso vivo individuale e l'ingestione di alimento per gabbia sono state rilevate quotidianamente su un totale di 32 gabbie per gruppo, al fine di calcolare l'incremento ponderale giornaliero e l'indice di conversione alimentare (ICA).

Ogni mattina, prima della distribuzione del mangime, si è provveduto all'allontanamento dei conigli morti e / o che presentavano sintomi di malattia (diarrea).

Le gabbie contenenti tali soggetti sono state escluse dallo studio.

3.3. Diete

La dieta basale comune a tutti i gruppi di animali in prova è stata rappresentata da una dieta del commercio, normalmente utilizzata in azienda e formulata in modo da coprire i fabbisogni nutritivi degli animali in accordo con le indicazioni di Gidenne (2000) i cui ingredienti erano, in ordine decrescente di contenuto: farina di erba medica disidratata, semola di grano, farina di semi di girasole, fieno di erba medica, mais, melassa di canna da zucchero, farina di soia tostata, carbonato di calcio, sale, olio di soia.

La composizione chimica della dieta espressa come percentuale sulla sostanza secca è riportata in tabella 1:

Tabella 1: composizione chimica della dieta.

SS	87.5
Ceneri	10.9
Proteine grezze	16.5
Estratto etereo	3.43
Fibra grezza	21.6
NDF	34.1
ADF	25.7
ADL	3.57

I quattro trattamenti alimentari applicati alla dieta basale sono di seguito descritti:

- antibiotici, ANT (colistina solfato 144, tilosina 100, e oxytetracyclin 1000 mg / kg), considerato come gruppo di controllo positivo;
- MOS _0.5 contenente mannanoligosaccaridi (Bio-Mos ®, Alltech Inc., USA) a 0,5 g / kg di dieta;
- MOS _1.0 (Bio- Mos ® a 1,0 g / kg),
- MOS _1.5 (Bio-Mos ® a 1,5 g / kg).

Un gruppo di controllo negativo è stato ottenuto da conigli alimentati con la stessa dieta, ma senza aggiunta di additivi.

Durante tutta la durata della prova, gli animali hanno avuto libero accesso sia agli alimenti che all'acqua di bevanda.

3.4. Procedure sperimentali

A 49 giorni di età, una settimana dopo lo scoppio della EEC in azienda, è stato campionato materiale rettale utilizzando dei tamponi in cotone su 8 animali sani per ogni trattamento, alle ore 13:00.

Il campionamento è stato effettuato per tre giorni consecutivi sugli stessi conigli in quanto i tamponi di cotone non consentono di raccogliere quantità precise di campione. I risultati utilizzati per l'analisi statistica rappresentano la media aritmetica dei tre prelievi. Solo in tre casi i campioni sono stati raccolti due volte, in seguito alla morte dei soggetti in prova.

I campioni sono stati trasportati utilizzando un sistema in anaerobiosi (w tampone cultura BBL più ammine / applicatore cap o singoli, BD).

Nel laboratorio (dopo circa 1 ora dal campionamento) i campioni sono stati introdotti in giare per anaerobiosi e poi direttamente sottoposti a diluizioni seriali con soluzioni di peptone

(Oxoid CM0009B). Per ogni diluizione, 0.1 ml sono stati introdotti in una piastra di Schaedler agar (+emina e vit.K, Oxoid PB5034A). Le piastre sono state incubate in condizioni di anaerobiosi per 24h a 37°C, usando le giare per anaerobi con un sistema che crea atmosfera anaerobia (AN0025 Oxoid). La conta totale di anaerobi è stata ottenuta differenziando i diversi ceppi batterici cresciuti in coltura, ed identificati in base alle loro caratteristiche morfologiche e biochimiche stabilite in base a criteri batteriologici (Neut et al., 1997).

In particolare, le colonie sospette sono state prelevate dalla piastra e fenotipicamente identificate sulla base delle differenziazioni morfologiche rinvenute con la colorazione di Gram, indolo negativi e catalasi positivi.

I Clostridi, infatti, sono anaerobi obbligati e produttori di endospore, Gram positivi, molto spesso pleomorfi e di solito catalasi negativi; *Cl. Perfringens* è indolo negativo e sulla piastra si sviluppa con colonie ad aspetto cremoso con doppio alone di emolisi; *Cl. Hystoliticum* è aerobio-tollerante, la crescita delle colonie avviene su agar sangue e non è emolitico.

I profili enzimatici si ottengono con l'API Rapid ID 32 A messo appunto per gli anaerobi.

I coefficienti di digeribilità apparente della sostanza secca, sostanza organica, proteine grezze, lipidi grezzi, fibra grezza, NDF, ADF, cellulosa ed emicellulosa sono stati misurati utilizzando le ceneri acido insolubili (CAI) come marker interno. Le feci sono state raccolte nel corso di tre giorni consecutivi (57 – 59 giorni di età) mediante reti di nylon piazzate sotto le gabbie utilizzate per le prove di accrescimento (25, 28, 26 e 22 gabbie, rispettivamente per i gruppi MOS_0.5, MOS_1.0, MOS_1.5, ANT). Le feci fresche sono state essiccate in una stufa a ventilazione forzata a 60 °C fino al raggiungimento di un peso costante e quindi sottoposte ad analisi. Il calcolo dei coefficienti di digeribilità apparente sono stati effettuati applicando la seguente formula:

digeribilità apparente (%) = 100 x [(% CAI nelle feci / % del nutriente nelle feci) - (% CAI nell'alimento / % del nutriente nell'alimento)] / (% CAI nelle feci / % del nutriente nelle feci).

3.5. Analisi chimiche

La composizione chimica della dieta basale, comune a tutti i gruppi in prova, e delle feci raccolte per le prove di digeribilità è stata effettuata in accordo con le seguenti metodiche proposte dall'AOAC (2004): sostanza secca, metodo numero 934.01; estratto etereo, metodo numero 920.39, ceneri 942.05, proteine grezze 954.01, fibra grezza 945.18; fibra resistente al detergente acido, lignina resistente al detergente acido, metodo numero 973.18; fibra resistente al detergente neutro trattata con alfa amilasi, metodo numero 2002.04.

Le ceneri acido insolubili (CAI) sono state determinate in accordo con Vogtmann *et al.* (1975) sia su campioni di alimento che su campioni di feci.

4. ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati attraverso l'analisi della varianza (SAS, 2000) utilizzando un modello ad una via per testare gli effetti dei vari additivi nella dieta.

La concentrazione batterica è stata soggetta ad una trasformazione in \log_{10} prima di essere elaborata al fine di normalizzarne la distribuzione.

Le medie sono state confrontate utilizzando i contrasti ortogonali. In particolare, tre contrasti sono stati studiati: ANT vs. la media di tutti e tre i gruppi MOS (0.5, 1.0 and 1.5), MOS 0.5 vs. la media dei gruppi MOS 1.0 + 1.5 e MOS 1.0 vs. MOS 1.5..

Le differenze tra le percentuali di mortalità sono state confrontate mediante test Chi-quadro.

5. RISULTATI

Durante la seconda e la terza settimana di prova (da 42 a 56 giorni di età) si è verificato un episodio di Enterocolite Enzootica del Coniglio e il tasso di mortalità in azienda ha superato il 35%. Ricordiamo che i conigli allevati nell'azienda dove si è svolta la prova ricevevano il mangime medicato (sotto regolare prescrizione veterinaria) allo stesso modo dei conigli del gruppo ANT. Nel gruppo di controllo negativo (che non riceveva nessun tipo di additivo nella dieta) il tasso di mortalità è stato superiore al 78% con elevato tasso di morbilità nei conigli superstiti. Per questo motivo, non è stato possibile effettuare gli usuali rilievi ponderali ed il gruppo di controllo negativo è stato escluso dalla prova. Il tasso di mortalità registrato in ciascun sottogruppo (32 gabbie) di animali utilizzato per monitorare le performance in vivo, ha rispecchiato quello del corrispondente gruppo. Pertanto, per evitare di utilizzare animali malati nel calcolo dei tassi di accrescimento e del consumo di alimento, le gabbie in cui uno o entrambi i conigli erano morti o mostravano segni di malattia (diarrea), sono state escluse dall'analisi statistica. Il tasso di mortalità (tabella 2) è stato pari a zero durante la prima settimana di prova per tutti i gruppi. Per le due settimane successive, quando si è verificato l'episodio di EEC, la percentuale di mortalità ha mostrato valori elevati. Il gruppo MOS_1.0 non ha fatto registrare decessi fino a due settimane più tardi, quando l'episodio di EEC ha ridotto la sua intensità negli altri tre gruppi. Durante le due settimane più "critiche", il gruppo ANT ha mostrato il tasso di mortalità più elevato.

Tabella 2. Effetti dell'utilizzo di antibiotici e dei mannanoligosaccaridi sul tasso di mortalità (%) durante la prova (n = 684/gruppo)

giorni	35-42	42-49	49-56	56-60	35-60
ANT	0	12.72 ^a	15.50 ^a	6.29 ^a	34.2 ^a
MOS_0.5	0	11.40 ^a	6.29 ^b	0 ^b	17.69 ^b
MOS_1.0	0	0 ^c	0 ^c	7.75 ^a	7.75 ^c
MOS_1.5	0	8.19 ^b	8.92 ^b	0 ^b	17.1 ^b

MOS_0.5, MOS_1.0 e MOS_1.5 diete in cui erano presenti i mannanoligosaccaridi in ragione di 0.5, 1.0 and 1.5 g/kg; ANT: dieta medicata; le medie nella stessa colonna con differenti lettere in apice differiscono per $P < 0.05$

I parametri dell'accrescimento (incremento ponderale, ingestione di alimento, indice di conversione alimentare) hanno avuto un andamento diverso durante prova a causa dell'episodio di enterocolite (tabella 3).

Tabella 3 –Effetto dell'utilizzo di antibiotici e MOS sull'incremento di peso vivo giornaliero, sulla media dell'ingestione giornaliera e sull'indice di conversione alimentare di conigli in accrescimento (35-60 giorni).

	ANT	MOS(g/kg)			SEM	Contrasti		
		0.5	1.0	1.5		ANT	MOS: 0.5	MOS: 1
n	22	25	28	26				
Svezzamento (35)								
Incremento di peso	39.1	44.5	44.6	41.7	0.83	<0.001	0.81	0.010
Ingestione di alim,	80.1	80.8	84.4	85.7	0.84	<0.001	<0.001	0.27
ICA, g/g	2.06	1.84	1.91	2.07	0.042	0.018	0.003	0.006
42-49 d								
Incremento di peso	31.8	30.8	36.2	37.9	0.53	<0.001	<0.001	0.02
Ingestione di alim,	97.1	89.5	94.5	94.9	1.00	0.001	<0.001	0.79
ICA, g/g	3.08	2.93	2.62	2.51	0.053	<0.001	<0.001	0.15
49-56 d								
Incremento di peso	45.2	38.3	42.1	36.5	0.69	<0.001	0.21	<0.001
Ingestione di alim,	118.5	110.5	105.7	112.3	1.72	<0.001	0.46	0.006
ICA, g/g	2.63	2.88	2.54	3.07	0.069	0.016	0.34	<0.001
56-60 d								
Incremento di peso	38.2	41.1	35.2	35.1	0.61	0.14	<0.001	0.87
Ingestione di alim,	148.1	140.1	126.0	133.8	2.12	<0.001	<0.001	0.008
ICA, g/g	3.88	3.41	3.58	3.81	0.079	0.005	0.004	0.040
Intero periodo								
Incremento di peso	38.6	38.6	39.5	37.8	0.31	0.85	0.99	<0.001
Ingestione di alim,	110.5	106.3	101.2	106.4	1.16	<0.001	0.090	0.002
ICA, g/g	2.87	2.76	2.57	2.82	0.038	0.001	0.18	<0.001

MOS: mannanoligosaccharidi; ANT: dieta contenente antibiotici;

SEM: errore standard delle medie

Tuttavia, considerando i valori medi dell'intero periodo (35 - 60 giorni), il gruppo ANT non ha mostrato differenze significative rispetto ai tre gruppi MOS, mentre il gruppo MOS_1.0 ha fatto riscontrare un incremento ponderale giornaliero più elevato rispetto al gruppo MOS_1.5 (P <0,001).

Nel confronto tra il gruppo MOS_0.5 e i gruppi MOS_1.0 e 1,5 non sono state riscontrate differenze significative ($P = 0,99$).

Durante tutte le settimane della prova, i conigli del gruppo ANT hanno mostrato una ingestione di alimento giornaliera diversa rispetto ai gruppi MOS.

In particolare, durante la prima settimana l'ingestione è stata significativamente più bassa rispetto ai gruppi MOS ($P < 0,001$), ma è risultata più elevata durante tutte le settimane successive ($P < 0,001$).

Il gruppo MOS_0.5 ha fatto registrare un'ingestione giornaliera più bassa rispetto agli altri gruppi MOS durante la prima, la seconda e l'ultima settimana di prova ($P < 0,001$).

Considerando l'intero periodo di sperimentazione, non ci sono state differenze statisticamente significative nell'ingestione volontaria di alimento tra i gruppi MOS_0.5 e gli altri gruppi MOS ($P = 0,090$).

Tra i 49 e i 56 giorni, il gruppo MOS_1.0 ha mostrato un'ingestione significativamente più bassa rispetto al gruppo MOS_1.5, differenza questa che si è mantenuta per tutta la durata della prova.

In accordo con il trend presentato dall'incremento di peso giornaliero e dall'ingestione di alimento, l'indice di conversione alimentare (ICA), ha avuto un comportamento differente nel corso delle settimane di prova.

Facendo riferimento all'intero periodo 35 - 60 giorni, il gruppo ANT ha mostrato un indice di conversione alimentare significativamente più elevato rispetto a quello dei gruppi MOS ($P = 0,001$); il gruppo MOS_0.5 non ha mostrato differenze rispetto agli altri gruppi MOS, mentre il gruppo MOS_1.0 ha fatto registrare un ICA significativamente più favorevole ($P < 0,001$) rispetto al gruppo MOS_1.5.

Nei conigli del gruppo ANT è stata registrata una più bassa digeribilità apparente di sostanza organica, proteine grezze, e fibra grezza (tabella 4) nel confronto con i gruppi alimentati con i mannaoligosaccaridi. L'analisi ortogonale non ha però mostrato alcuna differenza tra i gruppi MOS_0.5 e MOS_1.0 + 1,5 per quanto riguarda la digeribilità di SO, PG ed EE, mentre per la digeribilità della FG il gruppo MOS_0.5 ha mostrato valori più bassi rispetto ai gruppi MOS_1.0 + 1,5. Nel gruppo MOS_1.0 la digeribilità apparente dei nutrienti è stata sempre più elevata rispetto al gruppo MOS_1.5.

Tabella 4. Effetto degli antibiotici e dei MOS sulla digeribilità apparente (%) di sostanza organica, proteine grezze, estratto etereo e fibra grezza.

	ANT	MOS (g/kg)			SEM	Contrasti		
		0.5	1.0	1.5		Ant. vs. MOS	MOS 0.5 vs (1 + 1.5)	MOS 1 vs. 1.5
n	22	25	28	26				
S O	51.1	53.8	55.8	52.7	0.64	<0.001	0.63	<0.001
P G	70.5	72.3	74.1	72.0	0.61	0.003	0.34	0.010
EE	85.1	85.8	87.6	84.3	0.58	0.23	0.88	<0.001
FG	21.6	23.1	24.9	22.9	0.62	<0.001	0.020	<0.001

MOS: mannanoligosaccaridi; ANT: dieta con antibiotici; SEM: errore standard delle medie

I tamponi rettali dei conigli del gruppo ANT hanno presentato livelli più elevati di anaerobi totali, *Clostridium spp.* e *Cl. Hystoliticum*, rispetto ai gruppi MOS ($P < 0,001$, tabella 5).

Tabella 5. Effetto degli antibiotici e dei MOS sulla concentrazione di anaerobi totali, *Clostridium spp.* e *Clostridium hystoliticum* nei tamponi rettali (UFC/tampone) dei conigli in prova (n = 8/gruppo)

	ANT	MOS (g/kg)			SEM	Contrasti		
		0.5	1.0	1.5		Ant. vs. MOS	MOS: 0.5 vs. (1 + 1.5)	MOS: 1 vs. 1.5
n	22	25	28	26				
Anaerobi totali	6.85	6.36	5.51	6.15	0.08	<0.001	<0.001	<0.001
C. spp.	5.37	5.25	4.23	5.17	0.06	<0.001	<0.001	<0.001
C hystoliticum	3.92	1.14	1.51	1.71	0.02	<0.001	<0.001	<0.001

MOS: mannanoligosaccaridi; ANT: dieta con antibiotici; SEM: errore standard delle medie

Il gruppo MOS_0.5 ha mostrato livelli più elevati di anaerobi totali e *Clostridium spp.* ma i livelli più bassi di *Cl. hystoliticum* rispetto ai gruppi MOS_1.0 + 1,5 ($P < 0,001$). I conigli alimentati con mannanoligosaccaridi a 1.0 g/kg di dieta hanno fatto registrare valori più bassi di anaerobi totali, *Clostridium spp.* e *Cl. hystoliticum* rispetto al gruppo MOS_1.5. I dati relativi all'identificazione del *Cl. perfringens* non sono stati sottoposti ad elaborazione statistica (e non sono quindi riportati in tabella), in quanto tale microrganismo è stato rilevato in soli 3 conigli del gruppo di ANT (37,5%) e in 1 coniglio sia per i gruppi MOS_0.5 e 1,5 (12,5%). Non sono invece state identificate colonie ascrivibili al *Cl. perfringens* nel contenuto ciecale del gruppo MOS_1.0.

I risultati ottenuti per *Cl. perfringens* sono stati: 0,23, 0,14 e 0,04 log₁₀ UFC / tampone, rispettivamente per i gruppi ANT, MOS 0,5 e 1,5.

6. DISCUSSIONI

I nostri risultati suggeriscono che, in presenza di episodi di Enterocolite Enzootica del Coniglio (EEC), i mannanoligosaccaridi sembrano avere maggior effetto rispetto agli antibiotici utilizzati in questo studio, nel ridurre il tasso di mortalità.

Infatti, questa ultima è stata superiore nel gruppo ANT rispetto a quella riscontrata nei gruppi MOS.

La minore efficienza degli antibiotici rispetto ai mannanoligosaccaridi nel controllo del tasso di mortalità potrebbe essere giustificata da una resistenza agli antibiotici dei batteri coinvolti in questa patologia (Marlier et al., 2006). I mannanoligosaccaridi sono in grado di legare i recettori del mannosio presenti sulle fimbrie di tipo 1 di alcuni batteri patogeni (come *Escherichia coli* e *Salmonella Enteritidis*) al fine di prevenire il loro attacco alla mucosa intestinale (Spring et al, 2000; Firon et al, 1983).

Il mantenimento delle migliori condizioni del lume intestinale potrebbe impedire la proliferazione del *Cl. perfringens*. La concentrazione di 1,0 g / kg di MOS nella dieta è risultata essere migliore per ridurre il tasso di mortalità ad un livello compreso nel range considerato fisiologico. Gli stessi mannani alle concentrazioni di 0,5 o 1,5 g / kg di dieta hanno determinato una mortalità più bassa rispetto al gruppo alimentato con antibiotici, ma si sono dimostrati meno efficaci rispetto alla dose di 1 g/kg.

Mentre è piuttosto semplice pensare che la dose di 0.5 g/kg risulti non sufficiente a bloccare i patogeni che vengono a contatto con la mucosa del digerente, determinando comunque adesione di una parte di essi, risulta più difficile spiegare perché la concentrazione di 1,5 g / kg non abbia prodotto risultati simili o migliori di quelli avuti nei conigli alimentati con MOS a 1.0 g/kg. L'ipotesi che possiamo formulare è che a dosaggi più elevati i mannanoligosaccaridi possano in qualche modo interagire anche con la flora batterica saprofitica riducendone l'adesione alla mucosa intestinale. Tuttavia, questo risultato merita un maggiore approfondimento anche sulla base di analisi batteriologiche e istologiche che, in questa sede, non siamo stati in grado di produrre.

Un altro risultato che ci ha sorpreso è che non è stato possibile identificare microrganismi del genere *Bacteroides*, che normalmente dominano la flora intestinale dei conigli (Licois, 1998). Marlier *et al.* (2003) in conigli morti a causa dell'enterocolite enzootica riuscirono ad isolare i *Bacteroides* dal contenuto cecale soltanto in un numero molto ridotto di animali mentre in quasi tutti questi animali fu possibile isolare il *Cl. perfringens*. Nel nostro studio, i tamponi

rettali analizzati sono stati raccolti da animali senza segni clinici della malattia. Tuttavia, l'assenza di segni evidenti non indica necessariamente un buono stato di salute del tratto gastro-intestinale.

Per quanto riguarda il *Cl. perfringens*, è interessante notare che alcuni autori (Le Normand et al, 2003;. Dewrée et al, 2003;. Marlier et al, 2003;. Marlier et al, 2006) hanno dimostrato che questo microrganismo può giocare un ruolo importante nell'eziologia dell'enterocolite enzootica vista la sua proliferazione nel canale digerente, quando gli animali sono colpiti da EEC.

Anche Romero et al. (2009) hanno rilevato che la concentrazione nel contenuto cecale di *Clostridium perfringens* registrata 14 giorni dopo lo svezzamento era in stretta relazione ($R^2 = 0,961$, $P < 0,001$), mediante un'equazione di regressione quadratica, al tasso di mortalità causato da EEC.

I valori più elevati dei coefficienti di digeribilità che si sono ottenuti nel gruppo MOS_1.0 per quasi tutti i principi nutritivi testati suggeriscono un utilizzo più efficiente dei nutrienti nel tratto intestinale, che contribuisce ad un più favorevole indice di conversione alimentare nei confronti di altri gruppi.

Diversi autori (Pinheiro *et al.*, 2004, Mourao *et al.*, 2006) hanno riferito che l'apporto di MOS con la dieta, si accompagna ad un aumento della lunghezza dei villi intestinali nel tratto ileale, probabilmente come risultato del miglioramento dell'ambiente intestinale rispetto a conigli alimentati senza additivi. Un migliore sviluppo dei villi intestinali può giustificare anche una migliore utilizzazione dei nutrienti nel gruppo MOS_1.0.

Il gruppo MOS_1.5 ha mostrato un coefficiente di digeribilità apparente inferiore rispetto al gruppo MOS_1.0 per quanto riguarda tutti i nutrienti (SO, PG, EE, FG), suggerendo la formazione di un ambiente intestinale non del tutto favorevole.

Anche il gruppo MOS_0.5 ha mostrato coefficienti di digeribilità sempre inferiori rispetto al gruppo MOS_1.0.

Volek *et al.* (2007) utilizzando conigli svezzati a 25 giorni di età e alimentati con una concentrazione di MOS di 3 g / kg hanno riscontrato un tasso di mortalità più basso, accompagnato da un più basso coefficiente di digeribilità (misurato a 40 giorni di età) della sostanza organica, delle proteine grezze e della cellulosa rispetto al gruppo di controllo (senza additivi).

Mourao et al. (2006) non hanno rilevato differenze nell'indice di conversione alimentare in conigli alimentati con antibiotici rispetto a quelli che ricevevano MOS a tre diverse concentrazioni (1,0, 1,5 e 2,0 g / kg), mentre i gruppi MOS hanno mostrato un ICA

significativamente più basso ($P < 0,05$) rispetto al gruppo di controllo alimentato senza additivi. Tuttavia, questa prova è stata effettuata in un allevamento dove il tasso di mortalità nel gruppo alimentato senza aggiunta di additivi era 8,75%, ad indicare un buono stato sanitario dell'ambiente di allevamento.

7. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti sembrano indicare che in condizioni critiche determinate dal verificarsi di un episodio di Enterocolite Enzootica del Coniglio, i mannanoligosaccaridi possono avere un effetto positivo sul tasso di mortalità, sulle performance di accrescimento e sulla digeribilità dei nutrienti. I migliori risultati sono stati ottenuti con la concentrazione di 1,0 g / kg dieta di MOS.

8. BIBLIOGRAFIA

Association of Official Analytical Chemists (2004). Official methods of analysis, 2 vol., 18th edition. AOAC, Arlington, VA, USA.

Dewree R., Licois D., Coudert P., Lassence C., Vindevogel H., Marlier D. (2003). L'entéropathie épizootique du lapin (EEL): étude du rôle des infections par *Clostridium perfringens* dans l'étiopathogénie de ce syndrome. In: Proc. 10èmes Journées de la Recherche Cunicole, 2003 November, Paris, France, 251-254.

Firon N., Ofek I., Sharon N. (1983). Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. *Carbohyd. Res.* 120, 235–249.

Fonseca A.P., Falcao L., Kocher A., Spring P. (2004). Effect of dietary mannan oligosaccharide in comparison to oxitetracyclin on performance of growing rabbits. Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, C. Becerril and A. Pro (Eds.), Puebla, Mexico, 829-833.

Le Normand B., Le Guenec J., Moalic P.Y. (2003). Contribution à l'étude toxinotypique des souches de *Clostridium perfringens* isolées dans l'entéropathie épizootique du lapin (EEL). Relation avec la clinique observée. In: Proc. 10èmes Journ. Rech. Cunicole, 2003 November, Paris, France, 239-241.

Licois D. (1998). Bilan des travaux réalisés à l'INRA sur l'entérocolite épizootique, dans l'hypothèse d'une étiologie virale de la maladie. In: Proc. 7èmes Journées de la Recherche Cunicole, Séance d'actualité: L'entérocolite épizootique, 1998 May, Lyon, France, 20-25.

Licois D., Coudert P., Ceré N., Vautherot J.F. (2000). Epizootic enterocolitis of the rabbit: review of current research. In: Proc. 7th World Rabbit Congress, 2000 July, Valencia, Spain, 187-194.

Marlier D., Dewrée R., Licois D., Coudert P., Lassence C., Poulipoulis A., Vindevogel H. (2003). L'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL) : un bilan provisoire des résultats après 20 mois de recherches. In: Proc. 10èmes Journ. Rech. Cunicole, 2003 November, Paris, France, 247-250.

Marlier D., Dewrée R., Lassence C., Licois D., Mainil J., Coudert P., Meulemans L., Ducatelle R., Vindevogel H. (2006). Infectious agents associated with epizootic rabbit enteropathy: isolation and attempts to reproduce the syndrome. *Vet. J.* 172: 493-500.

Mourao J.L., Pinheiro V., Alves A., Guedes C.M., Pinto L., Saavedra M.J., Spring P., Kocher A. (2006). Effect of mannan oligosaccharides on the performance, intestinal morphology and caecal fermentation of fattening rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:107–120.

Neut C., Guillenot F., Colombel J.F. (1997). Nitrate-Reducing Bacteria in diversion colitis. A clue to inflammation? *Dig. Disease and Sci.* 42: 2577-2580.

Pinheiro V., Alves A., Mourao J.L., Guedes C.M., Pinto L., Spring P., Kocher A. (2004). Effect of mannan oligosaccharides on the ileal morphometry and caecal fermentation of growing rabbits. In Proceedings of the eighth World Rabbit Congress. Puebla, Mexico, pp. 936-941.

Romero C., Nicodemus N., García-Rebollar P., García-Ruiz A.I., Ibáñez M.A., De Blas J.C. (2009). Dietary level of fibre and age at weaning affect the proliferation of *Clostridium perfringens* in the caecum, the incidence of Epizootic Rabbit Enteropathy and the performance of fattening rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.* 153:131-140.

SAS/STAT (2000). Users Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Spring P., Wenk C., Dawson K.A., Newman K.E. (2000). The effects of dietary mannanoligosaccharides on caecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. *Poultry Sci.* 79: 205-211.

Szalo I.M., Lassence C., Licois D., Coudert P., Poulipoulis A., Vindevogel H., Marlier D. (2007). Fractionation of the reference inoculum of epizootic rabbit enteropathy in discontinuous sucrose gradient identifies aetiological agents in high density fractions. *Vet. J.* 173: 652-657.

Vogtmann H., Frirter P., Prabuck A.L. (1975). A new method of determining metabolizability of energy and digestibility of fatty acids in broiler diets. *Br. Poult. Sci.* 16: 531-534.

Volek Z., Marounek M., Skrivanova V. (2007). Effect of a starter diet supplementation with mannanoligosaccharide or inulin on health status, caecal metabolism, digestibility of nutrients and growth of early weaned rabbits. *Animal* 1: 523-530.

CAPITOLO 5

EFFETTO DEI MANNANOLIGOSACCARIDI SULL'ATTIVITA' FERMENTATIVA DELLA FLORA BATTERICA CECALE DEL CONIGLIO

1. INTRODUZIONE

Fin dai primi anni novanta, è cresciuto l'interesse verso la tecnica per la produzione di gas *in vitro* attraverso la quale è possibile sia studiare la cinetica delle fermentazioni ruminanti (Blümmel *et al.*, 1997; Calabrò *et al.*, 2002; Getachew *et al.*, 1998), che stimare la digeribilità in vivo degli alimenti per ruminanti (Blümmel *et al.*, 1993; Menke e Steingass, 1988).

Sulla base dei validi risultati già ottenuti, grazie al fatto di avere dei costi contenuti per la realizzazione delle prove sperimentali, e per lo sviluppo di un sistema automatico (Cone *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 2000; Pell and Schofield, 1993) in grado di registrare la produzione di gas in maniera continua durante le fermentazioni, la tecnica della produzione di gas *in vitro* (IVGPT), è stata recentemente utilizzata anche per i conigli, al fine di studiare le caratteristiche di fermentazione degli alimenti e delle diete per conigli (Calabrò *et al.*, 1999; Stanco *et al.*, 2003), nonché i cambiamenti delle attività della flora microbica cecale nel periodo intorno allo svezzamento (Gazaneo *et al.*, 2003).

La tecnica di produzione di gas *in vitro*, si basa sul fatto che in seguito alla digestione dei carboidrati da parte della flora anaerobica presente nel rumine e nel cieco, vengono prodotti gas (CO₂, CH₄ e tracce di H₂) e acidi grassi volati (acetico, propionico, butirrico ecc); le misurazione dei gas prodotti in seguito a tali fermentazioni vengono utilizzate per stimare la velocità e il grado di degradazione degli alimenti.

2. OBIETTIVO DELLA RICERCA

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'effetto della sostituzione degli antibiotici con i mannanoligosaccaridi a diverse concentrazioni (0,5; 1,0 e 1,5 g/kg di alimento) sulle fermentazioni della flora microbica cecale di coniglio, attraverso la produzione di gas in vitro (IVGPT).

3. MATERIALI E METODI

3.1. Animali e management

La prova è stata condotta su un totale di 3420 conigli svezzati (35 giorni di età), con un peso medio di 751.7 ± 56.0 g, appartenenti al tipo genetico Hyla. Gli animali sono stati omogeneamente divisi in 5 gruppi (684 conigli/gruppo) e accasati in gabbie bicellulari ($26 \times 46 \times 35$ cm, 2 conigli/gabbia, 342 gabbie/gruppo) all'interno dello stesso capannone.

3.2. Diete

La dieta basale comune a tutti i gruppi di animali in prova era una dieta di commercio, normalmente utilizzata in azienda, la cui composizione chimica è stata determinata in accordo con le seguenti metodiche proposte dall'AOAC (2004): sostanza secca, metodo numero 934.01; estratto etereo, metodo numero 920.39, ceneri 942.05, proteine grezze 954.01, fibra grezza 945.18; fibra resistente al detergente acido, lignina resistente al detergente acido, metodo numero 973.18; fibra resistente al detergente neutro trattata con alfa amilasi, metodo numero 2002.04.

Alla dieta basale, nel corso della prova, sono stati applicati quattro diversi trattamenti alimentari che hanno portato ad individuare i seguenti quattro gruppi :

- gruppo ANT, che riceveva un mix di antibiotici a largo spettro (colistina solfato 144, tilosina 100, e oxytetracyclin 1000 mg / kg), considerato come gruppo di controllo positivo;
- gruppo MOS_0.5 in cui la dieta basale era integrata con mannanoligosaccaridi (Bio-Mos ®, Alltech Inc., USA) alla dose di 0,5 g / kg;
- gruppo MOS_1.0 con mannanoligosaccaridi (Bio- Mos ®) a 1,0 g / kg,
- gruppo MOS_1.5 con mannanoligosaccaridi (Bio-Mos ®) a 1,5 g / kg.

Un gruppo di controllo negativo è stato ottenuto da conigli alimentati sempre con la stessa dieta basale, ma senza aggiunta di additivi.

Va precisato che l'azienda in cui si è svolta la prova, con anamnesi positiva per enterocolite enzootica del coniglio, utilizza regolarmente dietro prescrizione veterinaria mangimi medicati dello stesso tipo di quello utilizzato nella nostra prova.

Sia le diete che l'acqua di bevanda sono state somministrate *ad libitum*.

3.3. Produzione cumulativa di gas in vitro

La produzione cumulativa di gas *in vitro* (IVGPT) è stata misurata seguendo la procedura proposta da Theodorou *et al.* (1994), leggermente modificata. Il substrato incubato, per ciascuno inoculo è stato rappresentato dalla dieta basale, senza additivi aggiunti. Per ogni substrato, 1.0048 ± 0.0015 g di campione (in tre replicazioni per inoculo) sono stati pesati in bottiglie di vetro da 120 ml, aggiungendo 75 ml di medium anaerobio (Theodorou, 1993) e 4 ml di soluzione riducente.

Le bottiglie sono state chiuse ermeticamente mediante tappi di gomma circondati da ghiera di alluminio e incubate a 39°C fino al momento dell'inoculazione.

Il campionamento degli inoculi (contenuto cecale) è stato effettuato nella tarda mattinata (11.30 circa) in un macello specializzato, su 10 conigli per gruppo, a 60 giorni di età. E' stato possibile raccogliere campioni di contenuto cecale soltanto dai quattro gruppi ANT, MOS_0.5, 1.0 e 1.5. Infatti, a causa della percentuale di mortalità molto alta (78 %) e dei gravi sintomi di malattia (diarrea) negli animali superstiti, il gruppo di controllo negativo è stato escluso dalla sperimentazione. Dalla notte precedente la macellazione, gli animali sono stati tenuti a digiuno con acqua sempre a disposizione.

Una volta isolato il tratto gastro-intestinale, il contenuto cecale è stato raccolto, messo in un termos preriscaldato riempito fino all'orlo per ridurre al minimo il contenuto di aria e trasportato, nel tempo più breve possibile (circa 1 ora) presso i laboratori del nostro Dipartimento.

In laboratorio, 100 ml contenuto cecale sono stati diluiti con 100 ml di medium anaerobio, agitati per 5 minuti e filtrati attraverso sei strati di garza sotto flusso di anidride carbonica. Il residuo solido trattenuto sulla garza è stato miscelato con altri 100 ml di medium, omogeneizzati in un frullatore per 20 secondi sotto CO₂ e il prodotto ottenuto è stato rifiltrato attraverso sei strati di garza; il liquido risultante è stato miscelato con la prima quota e riscaldato a 39 °C sotto flusso di CO₂ fino al momento dell'uso (diluizione finale 2:1 medium:contenuto cecale).

La produzione di gas è stata rilevata ai seguenti intervalli post-inoculazione: 2, 4, 6, 9, 12, 14, 17, 21, 24, 29, 33, 37, 43, 48, 54, 68, 77, 96 e 120 h. Le letture iniziali sono state condotte ad intervalli di 2 ore a causa della più rapida produzione di gas.

La produzione di gas è stata misurata utilizzando un trasduttore di pressione collegato ad un rubinetto a tre vie. La prima uscita è collegata al trasduttore, la seconda ad una siringa di plastica, la terza ad un ago da di calibro 23 (0.6 mm).

Le pressioni prodotte dai gas accumulate nello spazio di testa della bottiglia (Pa) sono state rilevate introducendo l'ago attraverso il tappo di gomma della bottiglia e tenendo bloccato lo stantuffo della siringa. Annotato il valore delle pressione, i millilitri di gas prodotti sono stati misurati aspirando manualmente il gas con la siringa di plastica fino a quando il display del trasduttore di pressione non riportava una pressione uguale a quella ambientale. Effettuata la lettura, il gas veniva eliminato e le bottiglie, dopo agitazione, venivano risistemate nell'incubatore.

Al termine dell'incubazione (120 h), le bottiglie sono state refrigerate a 4°C per bloccare le fermentazioni. Il pH di ogni bottiglia è stato misurato mediante pHmetro (Alessandrini Instrument glass electrode, Jenway, Dunmow, UK; model 3030) e due campioni di liquido (ciascuno da 10 ml) per ogni bottiglia sono stati raccolti e congelati prima delle determinazioni di acidi grassi (AGV: acetato, propionato, butirrato, isobutirrato, acido valerianico, acido isovalerianico) e ammoniaca (NH₃), rispettivamente.

La digeribilità dei substrati è stata misurata filtrando il residuo attraverso crogioli di vetro con fondo a setto poroso (Scott Duran, porosità 2) sotto vuoto. La sostanza secca residua è stata determinata essiccando i crogioli a peso costante a 103°C, e la sostanza organica per differenza dopo incenerimento (5 h a 550°C).

I volumi di gas ottenuti sono stati rapportati alla quantità di sostanza organica incubata (OMCV) e degradata (YOM).

Dopo centrifugazione e diluizione dei campioni con acido ossalico (1:1 v/v), gli AGV sono stati determinati (Stanco *et al.*, 2003) mediante gascromatografo (ThermoElectron mod. 8000top, FUSED SILICA Gaschromatograph con OMEGAWAX 250 colonna capillare in silice 30m x 0.25mm x 0.25mm di spessore; temperatura di analisi 125°C; detector a ionizzazione di fiamma 185°C; gas carrier Helio 1.7 ml/min).

L'ammoniaca è stata determinata come descritto da Searle (1984). In breve, i campioni, dopo centrifugazione a 1,900 rpm per 10 min a temperatura ambiente (22°C), sono stati diluiti 10 volte con acqua e 1 ml del prodotto ottenuto è stato deproteinizzato usando acido tricloracetico al 10 %.

Ammoniaca e fenolo sono stati ossidati con sodio ipoclorito in presenza di sodio nitroprusside per formare un complesso di colore blu. L'intensità del colore ottenuto è stata misurata alla lunghezza d'onda di 623 nm. L'intensità del colore è direttamente proporzionale alla quantità di ammoniaca presente nel campione.

4. CALCOLI STECHIOMETRICI

Le produzioni teoriche di gas e sostanza organica fermentata sono state stimate secondo Groot *et al.* (1998) e sono state basate sulle equazioni di bilancio stechiometrico di Van Soest (1994), utilizzando le produzioni di acidi grassi volatili misurati nel contenuto cecale dei conigli in prova. La fermentazione della sostanza organica è stata espressa in glucosio equivalenti (g), i gas e gli acidi in moli. È stato assunto che gli equivalenti di glucosio sono fermentati a formare come prodotti finali acido acetico (Ace), propionico (Prop) e butirrico (But) e gas (anidride carbonica e metano) nonché incorporati a costituire biomassa microbica. Dalle equazioni stechiometriche può essere calcolato:

$$\mathbf{CO_2 \text{ (mmol)} = Ace \text{ (mmo)}/2 + Prop \text{ (mmol)}/4 + 3But \text{ (mmol)}/2}$$

$$\mathbf{CH_4 \text{ (mmol)} = Ace \text{ (mmol)} + 2But \text{ (mmol)} - CO_2 \text{ (mmol)}}$$

Il consumo di glucosio per la produzione di AGV e gas (sostanza organica fermentata, SO_f) è stato calcolato come:

$$\mathbf{SO_f \text{ (g)} = 162 \times [(2Ace \text{ (mmol)} + 3Prop \text{ (mmol)} + 4But \text{ (mmol)} + CO_2 \text{ (mmol)} + CH_4 \text{ (mmol)})]}$$

La sostanza organica fermentata SO_f, come percentuale della sostanza organica digerita SO (g), rappresenta la resa della sostanza organica fermentata (YF). La resa della sostanza organica per la sintesi microbica (YM, %) è stata stimata come (Groot *et al.*, 1998):

$$\mathbf{YM, \% = 100 - \%YF}$$

5. ANALISI STATISTICA

I dati relativi alla produzione cumulativa di gas sono stati interpolati mediante l'equazione di Groot *et al.* (1996):

$$G(t) = A/[1 + (B/t)^c]$$

Dove G (ml/g SO) è la quantità di gas prodotta per grammo di sostanza organica incubata; A (ml/g SO) è la produzione potenziale di gas; B (h) è il tempo di incubazione nel quale è stata raggiunta la produzione di gas pari ad A/2; C è la costante che determina la forma della curva. La velocità massima di fermentazione (Rmax, ml/h) ed il tempo al quale tale velocità viene raggiunta (Tmax, h) sono stati calcolati con la seguente equazione (Bauer *et al.*, 2001):

$$R_{max} = [A \times B^C \times C \times T_{max}(-C-1)]/[1 + (B^C) \times T_{max}-C]$$

$$T_{max} = B \times [(C-1)/(C+1)]^{1/C}$$

Tutte le caratteristiche di fermentazione sono state analizzate tramite analisi della varianza (SAS, 2000) usando il modello:

$$Y_{ij} = \mu + I_j + \epsilon_{ij}$$

dove Y è la singola osservazione; μ è la media generale; I è l'effetto dell'inoculo (j = ANT, MOS_0.5, MOS_1.0, MOS_1.5) ed ϵ è l'errore.

La differenza tra le medie è stata valutata utilizzando il Tukey test.

6. RISULTATI

La composizione chimica e gli ingredienti della dieta basale utilizzata come substrato per la prova *in vitro* sono riportati in tabella 1.

Tabella 1. Composizione Chimica della dieta basale

SS	Ceneri	PG	EE	FG	NDF	ADF	ADL
%	% SS						
87.5	10.92	16.46	3.43	21.57	34.12	25.73	3.57

Ingredienti: farina di erba medica disidratata, semola di grano, farina di semi di girasole, erba medica, mais, melassa di canna da zucchero, farina di soia tostata, carbonato di calcio, sale, olio di soia

La tecnica della produzione cumulativa di gas *in vitro* ampiamente utilizzata nelle specie ruminanti e, più recentemente, nei monogastrici, ha lo scopo originario di permettere lo studio delle caratteristiche di fermentazione degli alimenti per meglio definirne alcune caratteristiche nutritive.

Nel nostro caso, tuttavia, tale tecnica è stata utilizzata con uno scopo completamente diverso e cioè, a parità di substrato fermentato, andare a valutare le caratteristiche di fermentazione di contenuti ciecali prelevati da animali sottoposti a trattamenti alimentari diversi. È ovvio che le caratteristiche di fermentazione sono la diretta conseguenza dell'attività fermentativa della popolazione batterica presente nel grosso intestino dei coniglietti.

Dall'esame della tabella 2 appare evidente come i vari inocula abbiano presentato delle caratteristiche di fermentazione tra loro molto diverse. In particolare, il gruppo alimentato con 1 g/kg di MOS ha fatto registrare la più elevata digeribilità della sostanza organica ($P < 0.05$) e la maggiore produzione di gas (Gas, VCSO, Yield e A).

La velocità di fermentazione (R_{max}) è risultata significativamente ($P < 0.01$) più bassa rispetto al gruppo MOS_1.5. Il tempo necessario per raggiungere la velocità massima di fermentazione non è risultata, invece significativamente diversa dal gruppo MOS_0.5, che ha fatto registrare il valore più elevato. Infine, il tempo necessario a produrre una quantità di gas pari ad A/2 (B) è risultata significativamente ($P < 0.01$) minore rispetto al gruppo MOS_0.5.

Tabella 2. Digeribilità della SO, produzione di gas e cinetica di fermentazione degli inoculi testate .

	ANT	MOS 0.5	MOS 1.0	MOS 1.5	MSE
dSO, %	62.28 ^b	62.88 ^b	64.21 ^a	61.71 ^b	0.32
Gas, ml/g	229.7 ^C	240.1 ^B	262.3 ^A	245.5 ^B	4.95
VCSO, ml/g	279.9 ^B	296.4 ^{AB}	318.6 ^A	299.6 ^{AB}	40.92
YSO, ml/g	449.5 ^B	469.1 ^{AB}	509.2 ^A	488.2 ^{AB}	157.3
A, ml/g	246.9 ^b	249.5 ^b	261.5 ^a	251.6 ^{ab}	19.91
B, h	20.68 ^B	22.37 ^A	20.25 ^B	17.34 ^C	0.08
Tmax, h	8.04 ^{AB}	9.19 ^A	8.78 ^{AB}	7.58 ^B	0.11
Rmax, ml/h	7.27 ^{aC}	6.81 ^{bC}	7.91 ^B	8.89 ^A	0.017

dSO = degradabilità della sostanza organica; VCSO= volume cumulativo di gas derivante dall'incubazione della sostanza organica; YSO= produzione cumulativa di gas derivante dalla degradazione della sostanza organica; A = produzione potenziale di gas; B = tempo al quale A/2 è prodotto; Rmax = percentuale massima di fermentazione; Tmax = tempo al quale Rmax è raggiunto. A, B = P < 0.01; a, b = P < 0.05; MSE = errore quadratico medio; MOS_0.5, 1.0 e 1.5 = inoculi provenienti da conigli alimentati con MOS a 0.5, 1.0 e 1.5 g/kg; ANT = inoculo proveniente da conigli alimentati con antibiotico.

La cinetica di fermentazione può essere anche seguita valutando i grafici 1 e 2 che rappresentano, rispettivamente, l'andamento della produzione di gas e della velocità di fermentazione dei 4 inoculi testati. Per quanto riguarda la produzione di gas, è facile osservare che gli inoculi ottenuti dai gruppi MOS_1.0 e 1.5 hanno presentato simili cinetiche e lo stesso è accaduto per i gruppi ANT e MOS_0.5. Per quanto riguarda la velocità di fermentazione, il gruppo MOS_1.5 si distingue per una velocità iniziale molto elevata.

Grafico 1. Andamento della produzione di gas dei quattro inocula nel tempo

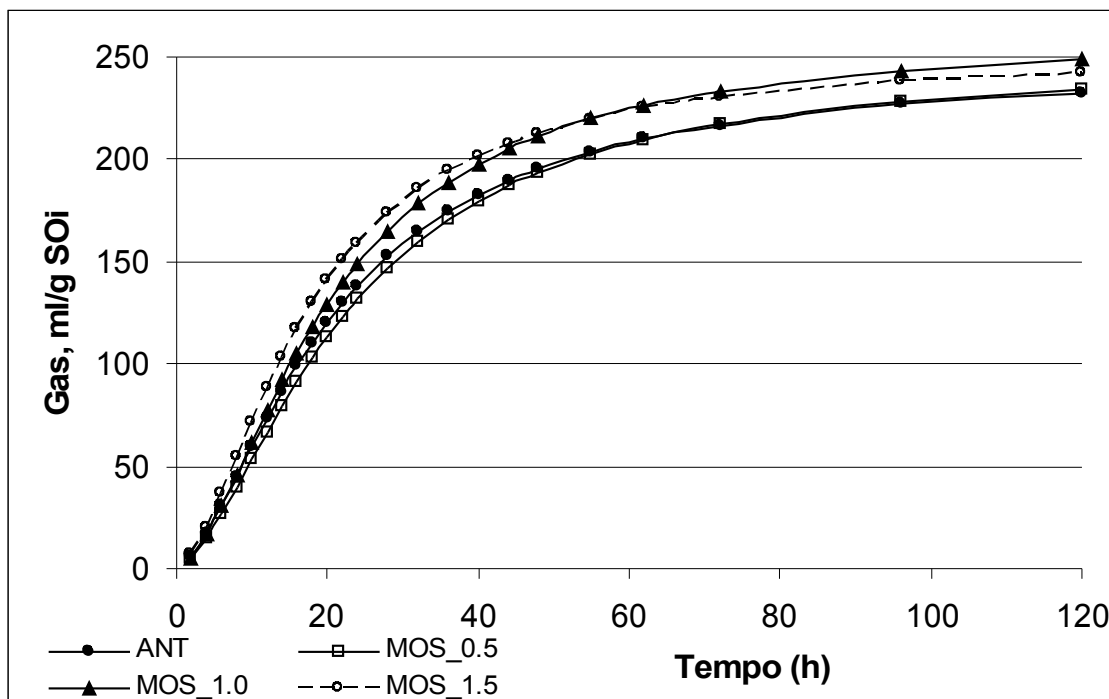
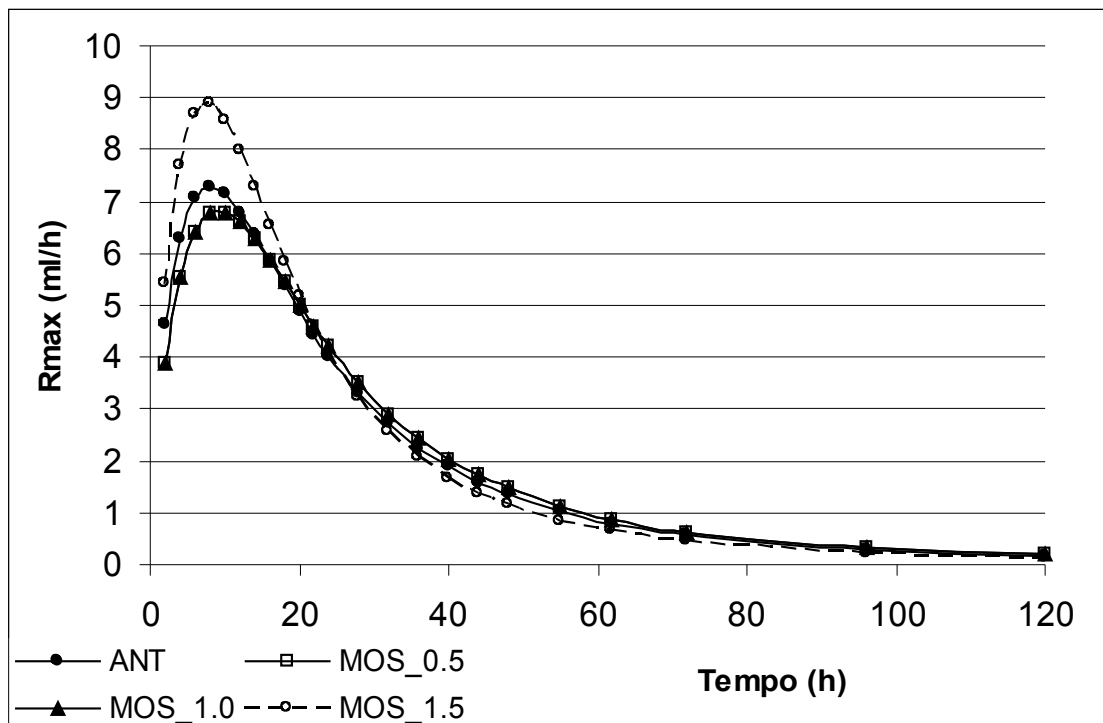


Grafico 2. Andamento della velocità di fermentazione dei quattro inocula nel tempo



Gli altri gruppi hanno una velocità di punta più bassa ma, in ogni caso, le curve si presentano con un andamento simile e le fermentazioni si esauriscono più o meno contemporaneamente per tutti gli inocula.

Il gruppo MOS_1.0 ha fatto registrare i valori significativamente più bassi di pH e più elevati per quasi tutti gli acidi grassi volatili misurati, compresi quelli totali (tabella 3).

La produzione degli acidi grassi a catena ramificata, è stata utilizzata per calcolare il Branched Chain Proportion (BCP) come segue:

$$\text{BCP} = (\text{isobutirrato} + \text{ac. isovalerianico})/\text{tAGV}.$$

Tale parametro, non è risultato significativamente diverso tra gli inoculi testati anche se il gruppo MOS_1.0 ha fatto comunque registrare il valore più elevato. La concentrazione di ammoniaca al termine delle fermentazioni non è risultata significativamente diversa tra i gruppi.

Table 3. pH, produzione di acidi grassi (mmol/g OM) e ammoniaca(mmol/l)

	ANT	MOS_0.5	MOS_1.0	MOS_1.5	MSE
pH	6.32 ^a	6.27 ^{ab}	6.23 ^b	6.27 ^{ab}	0.001
ac Acetico	69.46 ^{ab}	58.01 ^{bb}	96.99 ^A	67.14 ^{abB}	12.27
ac Butirrico	15.58 ^B	17.36 ^B	26.31 ^A	20.42 ^{AB}	4.52
ac Propionico	15.54 ^{ab}	14.60 ^b	19.19 ^a	17.23 ^{ab}	1.99
ac Isobutirrico	2.12	2.26	4.61	2.39	0.75
ac Valerianico	1.42 ^b	1.45 ^b	1.92 ^a	1.70 ^{ab}	0.02
ac Isovalerianico	1.34 ^{ab}	1.11 ^b	1.74 ^a	1.40 ^{ab}	0.04
Tot AGV	105.5 ^B	94.79 ^B	150.9 ^A	110.28 ^B	52.8
PCR	0.033 ^b	0.035 ^b	0.042 ^a	0.034 ^b	0.00003
NH₃	22.15	21.97	22.36	22.03	14.56

Tot AGV = produzione totale di acidi grassi volatili; PCR = proporzione degli acidi a catena ramificata; MOS_0.5, 1.0 e 1.5 = inoculi provenienti da conigli alimentati con MOS a 0.5, 1.0 e 1.5 g/kg; ANT = inoculo proveniente da conigli alimentati con antibiotico.

A, B = P < 0.01; a, b = P < 0.05; MSE = errore quadratico medio

In tabella 4 si riporta la quantità di SO utilizzata per le sintesi microbiche (YM,%) o per la fermentazione (YF,%). Il gruppo MOS_1.0 ha mostrato la maggiore produzione di biomassa microbica e, di conseguenza, la quantità più bassa di sostanza organica fermentata.

Tabella 4. Quantità di Sostanza Organica fermentata (YF) e quantità di Sostanza Organica utilizzata per le sintesi microbiche (YM) dai gruppi.

	YF, %	YM, %
ANT	81.97 ^A	18.03 ^B
MOS_0.5	81.98 ^A	18.02 ^B
MOS_1.0	81.03 ^B	18.97 ^A
MOS_1.5	81.86 ^A	18.13 ^B
MSE	0.63	0.63

A, B = P < 0.01, MSE = errore quadratico medio; MOS_0.5, 1.0 e 1.5 = inoculi provenienti da conigli alimentati con MOS a 0.5, 1.0 e 1.5 g/kg; ANT = inoculo proveniente da conigli alimentati con antibiotico.

7. DISCUSSIONI

In linea generale, il contenuto ciecale prelevato dai conigli del gruppo alimentato con mannanoligosaccaridi alla concentrazione di 1g/kg sembra possedere una più spiccata attività fermentativa nei confronti sia dei carboidrati che delle proteine, permettendo ai conigli di utilizzare in maniera migliore rispetto agli altri gruppi i principi nutritivi contenuti nella dieta. Da un lato, infatti, è possibile osservare una maggiore digeribilità della sostanza organica misurata a 120 ore dall'incubazione, e cioè ad attività fermentativa ormai esaurita, dall'altro la contemporanea maggiore produzione di gas, indica che è proprio la fermentazione dei carboidrati in generale a contribuire alla significativa più elevata digeribilità della sostanza organica. È noto, infatti che la fermentazione dei carboidrati da parte della flora batterica ciecale, è quella responsabile della maggiore produzione di gas: in particolare, proprio dall'attività fermentativa dei batteri cellulosolitici si liberano le maggiori quantità di gas sotto forma di anidride carbonica e di metano. Un contributo decisamente minore alla produzione di gas viene dato invece dalla fermentazione dei carboidrati di riserva (amido e zuccheri solubili).

Il gruppo MOS_1.0 è anche quello che ha fatto registrare in assoluto il valore di pH più basso rispetto a quello degli altri gruppi. In ogni caso, per tutti i gruppi in esame il pH si è mantenuto al di sotto di 6.4 e questo testimonia il buon andamento delle fermentazioni ciecali, tuttavia, entro certi limiti, più il pH al termine delle fermentazioni è basso e migliore è l'ambiente ciecale che si viene a creare. Andando ad analizzare il rapporto tra i principali acidi grassi volatili (i principali prodotti finali delle fermentazioni batteriche) appare evidente che, per tutti i gruppi in esame viene rispettata la proporzione che, nel coniglio, vede maggiori produzioni di acido acetico, seguite da quelle di acido butirrico e, infine, acido propionico (De Blas, 1988). Tuttavia, tra i quattro gruppi la proporzione molare tra i tre AGV appare un po' diversa. Bisogna innanzitutto considerare che, come risultato dell'attività fermentativa della flora batterica ciecale, gli AGV sono prodotti nella proporzione di 60-80 moli di acetato, 8-20 moli di butirrato e 3-10 moli di propionato per 100 moli di AGV (Gidenne, 1996), anche se queste proporzioni sono variabili in funzione del momento della giornata (e quindi dell'attività ciecotrofica) e dell'età dell'animale.

Nel nostro caso le proporzioni tra acetato, butirrato e propionato sono risultate: 69:16:15 per il gruppo ANT, 68:19:13 per il gruppo MOS_1.0 e 64:20:16 per i gruppi MOS_0.5 e 1.5.

È noto che l'acetato deriva dalla fermentazione dei carboidrati di struttura, mentre il propionato e il butirrato da quella dei carboidrati non strutturali (Van Soest, 1994). Quindi la maggiore proporzione di acetato nei due gruppi ANT e MOS_1.0 indica una più efficiente utilizzazione dei carboidrati di struttura. In ogni caso, rispetto al gruppo ANT, il gruppo MOS_1.0 presenta una più fisiologica proporzione, in particolare tra butirrato e propionato testimoniando un migliore andamento delle fermentazioni ciecali. È importante anche osservare che, durante le fermentazioni batteriche sono principalmente le produzioni di acetato e butirrato a contribuire alla produzione dei gas. Infatti, la produzione di acetato determina la produzione di una mole di CO₂ e una mole di CH₄ per mole di glucosio fermentato. Allo stesso modo, a quella di butirrato si accompagna alla produzione di 1.5 moli di CO₂ e 0,5 moli di CH₄ per mole di glucosio fermentato. La produzione di propionato, invece, non determina una produzione netta di CO₂ e richiede un input di equivalenti riducenti, cosa che determina una riduzione della produzione di metano (Ungerfeld e Kohn, 2006).

Così, la produzione significativamente più elevata di acetato e butirrato ottenuta con inoculo MOS_1.0 può giustificare la produzione di gas notevolmente superiore e suggerisce una maggiore attività fermentativa della microflora sia per quanto riguarda i carboidrati di struttura che per quelli non strutturali. Secondo quanto indicato da Marty e Vernay (1984), gli acidi grassi volatili possono essere metabolizzati nei tessuti del grosso intestino ed il butirrato è di gran lunga il substrato preferito dai colonociti. Di conseguenza, maggiore produzione di acetato sta ad indicare maggiore "nutrimento" per le cellule del grosso intestino e, di conseguenza, un loro migliore sviluppo. In ogni caso, il fegato è l'organo principale dove il propionato ed il butirrato assorbiti vengono metabolizzati. L'acetato è disponibile anche per il metabolismo dei tessuti extraepatici. Si stima che il coniglio possa ottenere fino al 40 % dell'energia richiesta per il mantenimento proprio dalla produzione degli AGV dovuta alle fermentazioni nel grosso intestino (Parker, 1976; Marty e Vernay, 1984). Il confronto tra le proporzioni molari dei principali acidi grassi volatili con dati presenti in letteratura riferiti a conigli alimentati con mannanoligosaccaridi sono piuttosto difficili da realizzare. Infatti, gli autori che maggiormente si sono dedicati a questo aspetto (Guedes *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2009) non hanno riscontrato sostanziali differenze nei rapporti tra acetato, butirrato e propionato tra gruppi di conigli alimentati con antibiotici o MOS alla concentrazione di 2 g/kg di dieta, pur avendo registrato maggiori produzioni di acido acetico e butirrico nel caso di integrazione dietetica con MOS.

Tuttavia bisogna sottolineare che quasi tutte le prove in cui vengono utilizzati mannanoligosaccaridi sono condotte in aziende di tipo sperimentale dove le condizioni ambientali sono molto più controllate (ridotta carica batterica ambientale) e, di conseguenza, le mortalità sono molto basse.

Infatti, nel caso delle due prove prima citate, la percentuale di mortalità si attestava al massimo intorno al 7 %. Nell'azienda in cui si è svolta la prova, di tipo commerciale, le condizioni ambientali sono decisamente meno controllate e la mortalità, in condizioni "normali" di allevamento si aggira intorno al 15-20 % nel periodo compreso tra lo svezzamento e 60 giorni di età.

È ovvio che in una situazione del genere la carica batterica ambientale risulterà decisamente più elevata e molto più evidente può risultare l'effetto di molecole ad effetto positivo sulla microflora fisiologicamente abitante il grosso intestino degli animali.

La produzione di acidi grassi a catena ramificata può darci, invece, informazioni sull'attività fermentativa dei batteri nei confronti delle proteine. È noto che la fermentazione delle proteine non determina produzione di gas. Tuttavia, acidi isobutirrico, isovalerianico (utilizzati nel calcolo del BCP) e l'acido valerianico derivano, rispettivamente, dalla degradazione degli aminoacidi valina, leucina e prolina (Van Soest, 1994). Quindi, a parità di proteine fermentate (nel senso sia di quantità che di qualità), una maggiore produzione di tali acidi grassi sta ad indicare una maggiore attività fermentativa nei confronti delle proteine (Bovera *et al.*, 2007). Ancora una volta è il gruppo MOS_1.0 a presentare i maggiori quantitativi di acidi grassi a catena ramificata ed anche la loro maggiore proporzione rispetto agli acidi grassi volatili totali (BCP) misurati a 120 ore dall'incubazione.

Anche l'ammoniaca deriva dalla degradazione degli aminoacidi, tuttavia la sua concentrazione può essere piuttosto variabile in funzione della disponibilità di catene carboniose. Infatti, i microorganismi combinano le catene carboniose (derivate dalla demolizione dei carboidrati) e l'ammoniaca per la sintesi di nuovi aminoacidi (Van Soest, 1994). Non essendoci una significativa maggiore produzione di ammoniaca nel caso del contenuto ciecale del gruppo alimentato con 1g/kg di MOS nella dieta, possiamo dedurre che la più intensa demolizione proteica (testimoniata dal più elevato BCP) viene comunque ben bilanciata da una maggiore fermentazione dei carboidrati con conseguente maggiore sintesi proteica dei batteri in quest'ultimo gruppo. Ciò è confermato dai dati riportati nella tabella 4. in cui l'inoculo MOS_1.0 ha mostrato valori significativamente più elevati della SO utilizzata per la crescita microbica (YM) e, di conseguenza, un valore significativamente inferiore di

fermentazione della materia organica (YF), stimato dalla concentrazione di AGV, rispetto a ciò che si è verificato negli altri gruppi.

Da quanto fin qui descritto sembra poter essere facilmente dedotto che i mannanoligosaccaridi aggiunti quali additivi alimentari in sostituzione degli antibiotici nelle diete per conigli riescono ad avere un effetto positivo sulle fermentazioni batteriche ciecali, determinando una migliore proporzione tra i principali AGV prodotti.

I mannanoligosaccaridi hanno la capacità di legare i mannosio-recettori presenti sulle fimbrie di tipo 1 di alcuni batteri patogeni (come *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*) prevenendo la loro adesione alle cellule della mucosa intestinale (Spring *et al.*, 2000; Firon *et al.*, 1983). Il mantenimento di migliori condizioni sanitarie nel lume intestinale è in grado di prevenire la proliferazione di batteri patogeni, come il *Clostridium perfringes*.

La concentrazione di 1.0 g/kg di MOS nella dieta sembra essere la migliore per la flora batterica ciecale e, di conseguenza, per le sue fermentazioni. Le dosi di mannani a 0.5 o 1.5 g/kg della dieta non migliorano in maniera statisticamente significativa le fermentazioni ciecali anche se la proporzione tra i principali AGV, come osservato prima sembra essere migliore rispetto al gruppo alimentato con antibiotici.

È facile ipotizzare che, per il gruppo MOS_0.5, la più bassa concentrazione di mannanoligosaccaridi nella dieta non sia stata sufficiente a legare i patogeni. Più difficile è, invece, spiegare perché la concentrazione più elevata di 1.5 g/kg non riesca a garantire risultati migliori o sovrapponibili ai conigli del gruppo MOS_1.0. La nostra ipotesi è che il più elevato livello di MOS possa interagire anche con i batteri saprofiti riducendo la loro capacità di adesione alle cellule della mucosa intestinale.

Questi risultati sono perfettamente in accordo con una precedente prova (Bovera *et al.*, 2009) nella quale, confrontando l'effetto di tre diversi livelli di MOS (0.5, 1.0 e 1.5 g/kg di dieta) contro antibiotici (gli stessi utilizzati in questa ricerca) sulle performance in vivo di conigli in accrescimento avevamo osservato che la mortalità nel periodo compreso tra 35 e 60 giorni risultava molto elevata nel gruppo ANT (35 %), pari a circa il 17 % per i gruppi MOS_0.5 e 1.5 e del 7.75 % nel gruppo alimentato con MOS a 1g/kg di alimento. Nella stessa prova era emersa, inoltre, una maggiore digeribilità dei principali principi nutritivi (misurata con il metodo delle ceneri acido insolubili) del gruppo MOS_1.0 rispetto a tutti gli altri. Questo dato, che giustificava il miglior indice di conversione alimentare registrato in questo gruppo veniva giustificato, come segnalato anche da Pinheiro *et al.* (2004) e Mourao *et al.* (2006) dal fatto che i mannanoligosaccaridi sono in grado di aumentare la lunghezza dei villi intestinali e la profondità delle cripte, probabilmente a seguito del miglioramento dell'ambiente intestinale

rispetto ai conigli alimentati senza additivi. È ovvio che tali risultati appaiono più evidenti quanto meno idonee sono le condizioni sanitarie degli allevamenti.

8. CONCLUSIONI

I mannanoligosaccaridi si confermano delle molecole molto interessanti, in grado di mantenere un adeguato stato sanitario dell'apparato digerente del coniglietto in accrescimento. In particolare, la dose di 1 g/kg di alimento migliora la digeribilità in vitro, aumenta la produzione di acidi grassi volatili a livello del cieco e favorisce una più intensa demolizione delle proteine che vengono quindi utilizzate in misura maggiore dai microrganismi ciecali per formare biomassa microbica.

9. BIBLIOGRAFIA

Association of Official Analytical Chemists (2004). Official methods of analysis, 2 vol., 18th edition. AOAC, Arlington, VA, USA.

Bauer E, Williams BA, Voigt C, Mosenthin R, Verstegen MWA (2001). Microbial activities of faeces from unweaned pigs in relation to selected fermentable carbohydrates. *Animal Science* 73, 313–322.

Blümmel, M., E.R. Ørskov. 1993. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughage in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 40: 109-119.

Blümmel, M., K. Becker. 1997. The degradability characteristics of fifty-four roughages and roughage neutral-detergent fibres as described by in vitro gas production and their relationship to voluntary feed intake. *Br. J. Nutr.* 77: 757-768.

Bovera, F.; D'Urso, S.; Calabro', S.; Tudisco, R.; Di Meo, C.; Nizza, A., 2007: Use of faeces as an alternative inoculum to caecal content to study in vitro feed digestibility in domesticated ostriches (*Struthio camelus* var. domesticus). *British Poultry Science* 48, 354–362.

Bovera F, D'Urso S, Di Meo C, Tudisco R, Nizza A (2009a). A model to assess the use of caecal and faecal inocula to study fermentability of nutrients in rabbit. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 93, 147-156.

Bovera F, Nizza S, Marono S, Maliardo K, Piccolo G, Tudisco R, De Martino L, Nizza A (2009b). Effect of mannan oligosaccharides on rabbit performance, digestibility and rectal bacterial anaerobic populations during an episode of Epizootic Rabbit Enteropathy. *World Rabbit Science*, in press.

Calabrò, S., A. Nizza, W. Pinna., M.I. Cutrignelli, V. Piccolo. (1999). Estimation of digestibility of compound diets for rabbits using the in vitro gas production technique. *World Rabbit Sci.* 7: 197-201.

Calabrò, S., F. Infascelli, F. Bovera, G. Moniello, V. Piccolo. (2002). In vitro degradability of three forages: fermentation kinetics and gas production of NDF and neutral detergent soluble fraction of forages. *J. Sci. of Food Agric.*, 82: 222 - 229.

Cone, J.W., A.H. Gelder, G.J.W. Visscher, L. Oudshoorn.(1996). Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 61: 113-128.

Davies, Z.S., D. Mason, A.E. Brooks, G.W. Griffith, R.J. Merry, M.K. Theodorou. (2000). An automated system for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, 83: 205-211.

Firon N, Ofek I, Sharon N (1983). Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhimurium*. *Carbohydrate Research* 120, 235–249.

Gazaneo, M.P., F. Bovera, C. Di Meo, G. Piccolo, A. Nizza. (2003). Effect of inoculum from suckling rabbits of different ages on fermentation parameters obtained with the in vitro gas production technique. *Proc. of Wild and domestic herbivore characterization*, 17-18 October, Yucatan, Mexico, pp. 57-59.

Getachew, G., M. Blümmel, H.P.S. Makkar, K. Becker. (1998). In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 72: 261-281.

Gidenne T (1996). Nutritional and ontogenic factors affecting the rabbit caeco-colic digestive physiology. In: Lebas, F. (Ed.), *Proceedings of the World Rabbit Congress*. INRA, Toulouse, pp. 13–28.

Groot JC, Williams BA, Oostdam AJ, Boer H, Tamminga S (1998). The use of cumulative gas and volatile fatty acid production to predict in vitro fermentation kinetics of Italian ryegrass leaf cell walls and contents at various time intervals. *British Journal of Nutrition* 79, 519–525.

Guedes CM, Mourao JL, Silva SR, Gomes MJ, Rodrigues MAM, Pinheiro V (2009). Effect of age and mannanoligosaccharides supplementation on production and volatile fatty acids in the caecum of rabbits. *Animal Feed Science and Technology* 150, 330-336.

Marty J, Vernay M (1984). Absorption and metabolism of the volatile fatty acids in the hindgut of the rabbit. *British Journal of Nutrition* 51, 265-277.

Menke, K.H., H. Steingass. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.*, 28: 7-12.

Pell, A.N., P. Schofield. (1993). Computerised monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *J. Dairy Sci.*, 76: 1063-1073.

Pinheiro V, Guedes CM, Outor-Monteiro D, Mourao JL (2009). Effect of fibre level and dietary mannanoligosaccharides on digestibility, caecal volatile fatty acids and performances of growing rabbits. *Animal Feed Science and Technology* 148, 288-300.

SAS/STAT Users Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Searle PL (1984). The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen. A review. *Analyst* 109, 549–568.

Spring P, Wenk C, Dawson KA, Newman KE (2000). The effects of dietary mannanoligosaccharides on caecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of salmonella-challenged broiler chicks. *Poultry Science* 79, 205-211.

Stanco G, Di Meo C, Piccolo G, Nizza A (2003). Effect of storage duration on frozen inoculum to be used for the in vitro gas production technique in rabbit. *Italian Journal of Animal Science* 2, 265–270.

Stanco, G., C. Di Meo, S. Calabrò, A. Nizza. (2003). Prediction of nutritive value of diets for rabbits using an in vitro gas production technique. *World Rabbit Sci.*, 11: 199-210.

Theodorou MK (1993). A new laboratory procedure for determining the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Ciencia e Investigacion Agraria* 20, 332–344.

Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J (1994). A simple gas production method using pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48, 185–197.

Ungerfeld EM, Kohn AN (2006). The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. In: *Ruminant Physiology*. Ed. Sejrsen K., Hvelpund T., Nielsen M.O., Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp. 55-85.

Van Soest PJ (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd ed. Ithaca, NY: Comstock Publishing Associates, pp. 354–370.

CAPITOLO 6

EFFETTO DELL'UTILIZZO DI MANNANOLIGOSACCARIDI SULLE PERFORMANCE IN VIVO, SULLA DIGERIBILITA' DEI NUTRIENTI E SULLE CARATTERISTICHE DEL CONTENUTO CECALE DI CONIGLI IN FASE DI ACCRESCIMENTO

1. OBIETTIVO DELLA RICERCA

Lo scopo del nostro studio è stato quello di confrontare le performance in vivo, la digeribilità dei nutrienti, le caratteristiche di fermentazione e la popolazione microbica cecale di conigli alimentati con diete senza additivi, con antibiotici o con MOS.

2.MATERIALI E METODI

2.1. Animali e management

La prova ha avuto inizio alla fine di settembre 2009.

Un totale di 144 conigli ibridi Hyla (peso medio 764.5 g, rapporto maschi:femmine 1:1) sono stati omogeneamente suddivisi, allo svezzamento (35 giorni), in 3 gruppi e accasati in gabbie bicellulari (26×46×35 cm, 2 conigli/gabbia, 24 gabbie/gruppo) all'interno dello stesso capannone.

2.2. Diete

I tre gruppi hanno ricevuto, fino all'età di 62 giorni, lo stesso mangime del commercio, rispettivamente: senza nessun additivo (gruppo controllo, CONT); con l'aggiunta di mannanoligosaccaridi (Bio-Mos®, Alltech Biotechnology, USA) alla dose di 1 g/kg di alimento (gruppo MOS) e con l'aggiunta di antibiotici (colistina solfato, 144 mg/kg; tilosina, 100 mg/kg; ossitetraciclina, 1000 mg/kg), secondo normale consuetudine aziendale (gruppo ANT).

La concentrazione di 1g/kg di MOS è stata scelta sulla base di studi precedenti (Bovera *et al.*, 2010a and b). L'azienda, che presenta un'anamnesi positiva per l'Enteropatie Enzootica, adotta normalmente, sotto regolare prescrizione veterinaria, un mangime additivato con antibiotici nel periodo 35 – 60 giorni.

Sia le diete che l'acqua sono state somministrate *ad libitum*.

2.3. Rilievi ponderali e procedure sperimentali

Quotidianamente è stata registrata la mortalità. I conigli deceduti sono stati rimossi dalle gabbie e queste ultime escluse dalla prova. Tutti i conigli sono stati pesati con cadenza settimanale in modo da poter calcolare l'incremento ponderale giornaliero.

L'ingestione volontaria di alimento è stata registrata settimanalmente per mangiatoia (una mangiatoia per gabbia, 24 osservazioni) e, tenendo conto dell'incremento di peso vivo calcolato per mangiatoia, si è provveduto a calcolare l'indice di conversione alimentare.

I coefficienti di digeribilità apparente della sostanza secca, sostanza organica (SO), proteine grezze (PG), lipidi grezzi (LG), fibra grezza (FG), fibra neutro detersa (NDF), fibra acido

detersa (ADF), cellulose ed emicellulosa sono stati misurati usando le ceneri acido insolubili (CAI) come marker interno.

Le feci sono state raccolte nel corso di tre giorni consecutivi (57 – 59 giorni di età) usando reti di nylon piazzate sotto le gabbie utilizzate per le prove di accrescimento. Le feci fresche sono state essiccate in una stufa a ventilazione forzata a 60 °C fino al raggiungimento di un peso costante e quindi sottoposte ad analisi.

Il calcolo dei coefficienti di digeribilità apparente sono stati effettuati applicando la seguente formula:

digeribilità apparente (%) = $100 \times [(\% \text{ CAI nelle feci} / \% \text{ del nutriente nelle feci}) - (\% \text{ CAI nell'alimento} / \% \text{ del nutriente nell'alimento})] / (\% \text{ CAI nelle feci} / \% \text{ del nutriente nelle feci})$.

All'età di 62 giorni, 10 conigli per gruppo sono stati sacrificati e il contenuto dei ciechi è stato prelevato, posto in buste sterili individuali ermeticamente chiuse, collocato in borse termiche e trasportati quanto più rapidamente possibile (circa 1 ora) presso i laboratori del nostro Dipartimento, dove sono stati sottoposti ad analisi chimica.

Due aliquote di contenuto cecale (circa 5 ml ciascuna) sono state prelevate e sottoposte, rispettivamente ad analisi per la determinazione degli acidi grassi volatili (AGV) e del contenuto di ammoniaca. Dopo diluizione dei campioni con acido ossalico (1 : 1 v/v), gli AGV sono stati determinati mediante metodo gas-cromatografico (ThermoElectron mod. 8000top, FUSED SILICA Gaschromatograph, ThermoElectron Corporation, Rodano, Milano, Italy) con colonna capillare (OMEGAWAX 250 fused silica, 30m30.25mm30.25mm film thickness; temperatura di analisi, 125°C; detector a fiamma ionica, 185°C; gas carrier elio, 1.7 ml/min; Stanco et al., 2003).

La proporzione degli acidi grassi a catena ramificata (BCP), importante indice di degradazione proteica, è stato determinato come somma degli acidi isobutirrico e isovalerico diviso per la produzione totale di AGV.

Il contenuto di ammoniaca (NH₃) è stato determinato con il metodo descritto da Searle (1984). In breve, i campioni, dopo centrifugazione a 610 x g per 10 min a temperatura ambiente (circa 22°C), sono stati diluiti 10 volte con acqua e quindi 1 ml di prodotto è stato deproteinizzato utilizzando sodio ipoclorito in presenza di sodio nitroprusside per formare un complesso di colore blu.

L'intensità della colorazione è stata misurata colorimetricamente alla lunghezza d'onda di 623 nm. L'intensità della colorazione blu è proporzionale alla concentrazione di NH₃ nel campione.

Inoltre, parte del contenuto cecale è stato utilizzato per analisi microbiologiche.

Nel laboratorio (dopo circa 1 ora dal campionamento) i campioni sono stati introdotti in giare per anaerobiosi e poi direttamente sottoposti a diluizioni seriali con soluzioni di peptone (Oxoid CM0009B). Per ogni diluizione, 0.1 ml sono stati introdotti nelle piastre di Schaedler Sangue-agar (+emina e vit.K, Oxoid PB5034A), MacConkev agar, Slanetz agar e Plate count agar al fine di identificare, rispettivamente, gli anaerobi, i *Coliformis*, gli *Enterococcus faecalis* e procedere alla conta batterica totale.

Le piastre sono state incubate in condizioni di anaerobiosi per 24h a 37°C, usando le giare per anaerobiosi con un sistema che crea atmosfera anaerobia (AN0025 Oxoid). La conta totale di anaerobi è stata effettuata differenziando i *Coliformis* e gli *Enterococcus*.

2.4. Analisi chimiche

Le analisi chimiche della dieta (tabella 1), dei campioni di feci e di contenuto cecale sono state effettuate in accordo con le seguenti procedure AOAC (2004): sostanza secca (934.01), estratto etero (920.39), ceneri (942.05), proteine grezze (954.01), fibra grezza (945.18), fibra resistente al detergente acido e lignina al detergente acido (973.18), fibra resistente al detergente neutro con pretrattamento amilasico (2002.04). Il contenuto di emicellulosa è stato calcolato come differenza tra NDF e ADF. Il contenuto di cellulosa è stato stimato sottraendo all'ADF l'ADL. Le ceneri acido insolubili nelle feci e nella dieta sono state determinate secondo Vogtmann *et al.* (1975).

Tabella 1. Composizione chimica della dieta utilizzata nella prova.

SS	Ceneri	PG	EE	FG	NDF	ADF	ADL
%	% SS						
88.02	10.61	16.92	3.56	20.93	36.11	21.40	2.71

SS = sostanza secca; PG = proteine grezze; EE = estratto etero; FG = fibra grezza; NDF = fibra neutro detersa; ADF = fibra acido detersa; ADL = lignina acido detersa.

3. ANALISI STATISTICA

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (SAS, 2000) utilizzando il modello:

$$Y_{ij} = m + T_i + e_{ij}$$

dove Y è la singola osservazione, m la media generale, T il trattamento alimentare (i = controllo, MOS e ANT), e l'errore. Le concentrazioni batteriche sono state sottoposte a trasformazione in logaritmo a base 10 prima dell'analisi statistica allo scopo di normalizzare la distribuzione.

Le differenze tra le medie sono state valutate mediante Tukey test (SAS, 2000). Le differenze tra le mortalità sono state analizzate mediante test chi-quadro.

4. RISULTATI

Durante la prova non sono stati registrati eventi patogeni. La mortalità nel corso della prova non ha fatto registrare differenze statisticamente significative tra i gruppi e si è attestata mediamente sull'11.5 %.

In tabella 2 si riportano i risultati relativi ai rilievi in vivo eseguiti nel corso della prova.

I conigli del gruppo controllo hanno fatto registrare un peso a 62 giorni significativamente più basso ($P < 0.01$) rispetto agli altri gruppi. Anche l'incremento ponderale giornaliero è risultato significativamente inferiore rispetto agli altri due gruppi ($P < 0.01$ vs. gruppo ANT e $P < 0.05$ vs. gruppo MOS) e l'ingestione volontaria di alimento è risultata significativamente più elevata ($P < 0.05$) nel gruppo ANT. In ogni caso non sono state registrate differenze statisticamente significative tra gli indici di conversione alimentare

Tabella 2. Rilievi in vivo

	PV 35 gg g	PV 62 gg g	IPG 35-62 g/d	Ingestione g/d	ICA
Controllo	763.4	1638.9 ^B	31.02 ^{Bb}	109.3 ^b	3.67
MOS	761.7	1779.4 ^A	36.18 ^{ABa}	114.7 ^{ab}	3.29
Antibiotici	768.4	1826.5 ^A	37.79 ^A ^a	127.9 ^a	3.58
P	0.9253	<0.0001	0.0007	0.0163	0.3366
SEM	1.34	0.49	0.32	1.11	0.22

PV= peso vivo; IPG = incremento di peso giornaliero; I = ingestione; ICA = indice di conversione alimentare; CONT = gruppo di controllo; MOS =dieta con mannanoligosaccaridi; ANT =dieta con antibiotici; SEM = errore standard delle medie

I coefficienti di digeribilità dei principi nutritivi (tabella 3) hanno fatto evidenziare importanti differenze tra i gruppi nel caso della digestione delle componenti fibrose della dieta. In particolare, il gruppo alimentato con antibiotici ha fatto registrare una più bassa digeribilità della fibra grezza, mentre il gruppo alimentato con MOS ha mostrato una significativamente più elevata digeribilità sia della ADF che della cellulosa.

Tabella 3. Digeribilità (%) dei principi nutritivi.

	Controllo	MOS	Antibiotici	P	SEM
dSS	61.33	62.50	61.36	0.355	5.27
dSO	62.84	63.98	62.05	0.143	4.36
dPG	74.66	75.60	73.78	0.2202	6.42
dLG	84.59	83.97	85.37	0.288	5.13
dFG	28.19 ^{ABa}	30.67 ^{Aa}	27.66 ^{Bb}	0.031	5.02
dNDF	39.65	40.16	38.55	0.267	6.27
dADF	24.29 ^B	29.98 ^A	24.21 ^B	0.0003	4.13
dCell	29.61 ^{Bb}	34.27 ^{Aa}	27.49 ^{Bc}	< 0.0001	5.52
dEmicell	51.70	52.45	50.13	0.1253	7.06

CONT = gruppo di controllo; MOS =dieta con mannanoligosaccaridi; ANT =dieta con antibiotici; SEM =;errore standard delle medie A, B = P < 0.01; a, b = P < 0.05.

La produzione di acidi grassi volatili (tabella 4) mostra una produzione totale di AGV e di acetato significativamente più elevata nel gruppo alimentato con MOS, seguito dal gruppo controllo e da quello alimentato con antibiotici. Ancora, il gruppo alimentato con antibiotici ha fatto registrare la più bassa produzione di propionato, mentre non sono emerse differenze statisticamente significative tra le produzioni di butirrato.

Tabella 4. Analisi delle fermentazioni glucidiche del contenuto cecale.

	Acetato	Propionato	Butirrato	tAGV
	Mmol/l	Mmol/l	Mmol/l	Mmol/l
Controllo	34.21 ^B	2.96 ^{AB}	4.39	43.88 ^B
MOS	39.93 ^A	4.14 ^A	4.84	52.27 ^A
Antibiotici	23.09 ^C	2.09 ^B	3.66	30.42 ^C
P	< 0.0001	0.0117	0.2039	< 0.0001
SEM	4.20	2.82	2.89	5.49

CONT = gruppo di controllo; MOS =dieta con mannanoligosaccaridi; ANT =dieta con antibiotici; SEM =;errore standard delle medie A, B, C = P < 0.01.

In tabella 5 si riportano i contenuti di acidi grassi a catena ramificata, il BCP e di ammoniaca del contenuto cecale dei tre gruppi in prova.

Il gruppo alimentato con MOS ha fatto registrare le produzioni significativamente più elevate di acido valerianico, isovalerianico e isobutirrico con conseguente valore significativamente più elevato di BCP. I contenuti di ammoniaca sono stati invece significativamente più elevati nel gruppo controllo.

Tabella 5. Analisi delle fermentazioni proteiche del contenuto cecale.

	Isobutirrico	Isovalerianico	BCP	Valerianico	NH₃
	Mmol/l	Mmol/l		Mmol/l	Mmol/l
Controllo	0.86 ^{Ab}	0.63 ^B	0.03 ^B	0.82 ^{ab}	5.31 ^A
MOS	1.11 ^{Aa}	1.27 ^A	0.05 ^A	0.98 ^a	3.97 ^B
Antibiotici	0.47 ^{Bc}	0.49 ^B	0.03 ^B	0.63 ^b	3.69 ^B
P	<0.0001	<0.0001	0.0005	0.03	<0.0001
SEM	1.09	0.87	0.20	1.24	1.69

CONT = gruppo di controllo; MOS =dieta con mannanoligosaccaridi; ANT =dieta con antibiotici; SEM =errore standard delle medie A, B = P < 0.01; a, b = P < 0.05. BCP = branched chain proportion

In tabella 6 vengono riportate le popolazioni batteriche (carica batterica totale, coliformi e anaerobi totali) del contenuto cecale dei tre gruppi in prova. Differenze significative sono emerse soltanto nel caso dei *Coliformi*, risultati significativamente più elevati negli animali del gruppo controllo. Nessuna differenza è emersa tra gli altri due gruppi.

Tabella 6. Conta batterica (logUFC/g) del contenuto cecale.

	TBC	Coliformi	Anaerobi
Controllo	6.13	3.20 ^B	5.26
MOS	6.21	2.32 ^A	5.80
Antibiotici	5.72	2.40 ^B	5.26
P	0.25	0.005	0.745
SEM	0.98	0.08	1.11

CONT = gruppo di controllo; MOS =dieta con mannanoligosaccaridi; ANT =dieta con antibiotici ; SEM =errore standard delle medie; A, B = P < 0.01.

5. DISCUSSIONI

In assenza di eventi patogeni, sia gli antibiotici che i mannanoligosaccaridi non modificano la percentuale di mortalità rispetto al gruppo controllo ma sono in grado di migliorare le performance produttive dei conigli in produzione zootecnica nella fase di accrescimento permettendo il raggiungimento di risultati simili.

Tuttavia, le “modalità” di azione sembrano diverse. Infatti, il maggiore peso vivo raggiunto a fine prova dai conigli alimentati con MOS rispetto a quelli del gruppo controllo non è dovuto ad una maggiore ingestione di alimento (soltanto 5.4 g/d di alimento in più a fronte di un incremento ponderale superiore di 5.2 g/d), cosa che si verifica invece nel caso del gruppo alimentato con antibiotici, bensì ad una maggiore digeribilità di alcuni principi nutritivi della dieta.

I conigli del gruppo MOS, infatti, presentano una maggiore digeribilità della ADF da ricondurre ad una migliore digeribilità della cellulosa rispetto agli altri due gruppi. Poiché la digestione dei carboidrati di riserva nel coniglio avviene nel grosso intestino ad opera della flora batterica, sembra evidente che gli additivi utilizzati nella prova sono in grado di interagire e quindi modificare la microflora batterica del cieco o, quantomeno, la sua attività fermentativa.

Questa ipotesi viene confermata dall'analisi della produzione degli acidi grassi volatili nel cieco dei conigli in prova. Il gruppo alimentato con i MOS ha fatto registrare le più elevate produzioni di acido acetico e AGV totali mentre il gruppo alimentato con antibiotici mostra le più basse produzioni di acetato e di propionato. È noto (Van Soest, 1993) che l'acido acetico rappresenta il prodotto finale della fermentazione della cellulosa mentre gli acidi propionico e butirrico derivano dalla fermentazione dei carboidrati di riserva. Di conseguenza, per i conigli del gruppo MOS si conferma una più intensa attività cellulolitica dei batteri cecali, in accordo con quanto trovato da Bovera et al. (2010b), mentre il gruppo alimentato con antibiotici presenta una minore attività fermentativa nei confronti sia dei carboidrati di riserva che di quelli di struttura.

Il butirrato sembra essere una fonte preferenziale di energia per il tratto intestinale, mentre l'acetato è metabolizzato prevalentemente nel fegato per la lipogenesi e la colesterologenesi (Vernay, 1987). Tuttavia, considerando il profilo degli AGV specifici per il coniglio in cui si ha una predominanza di acetato (60 - 80 mmol/100 ml) (Gidenne *et al*, 1988.), seguita da

butirrato (8 - 20 mmol/100 ml) e poi da propionato (3-10 mmol/100 ml), i nostri risultati rientrano nel range di normalità.

In effetti, le percentuali di acetato, butirrato e propionato sono 80:6.7:10; 76.4:7.9:9.3; 75.9:6.9:12.0, rispettivamente per il gruppo CONT, per i gruppi MOS e ANT.

Il contenuto cecale dei conigli alimentati con MOS presenta anche una maggiore attività di degradazione nei confronti delle proteine rispetto agli altri due gruppi, come testimoniato dal significativo più elevato valore di BCP. Infatti gli acidi grassi a catena ramificata isobutirrico, isovalerico e valerico sono prodotti rispettivamente dalla degradazione degli aminoacidi valina, leucina e prolina (Van Soest, 1994); di conseguenza, una più elevata proporzione di acidi isobutirrico e isovaleriano sugli AGV totali (BCP) è indicativa di una più intensa degradazione proteica (Bovera *et al.*, 2007). Anche l'ammoniaca è un indice di degradazione delle proteine, tuttavia, essa, in combinazione con le catene carboniose derivanti dalla fermentazione dei carboidrati, viene utilizzata per la sintesi di nuovi aminoacidi indispensabili per la crescita microbica (Van Soest, 1994).

Nella nostra prova, i gruppi alimentati con antibiotici e MOS non hanno fatto registrare differenze nella produzione cecale di ammoniaca, mentre il gruppo controllo ha presentato i valori significativamente più elevati. Il più basso o simile tenore di ammoniaca a fronte di una maggiore degradazione proteica può essere spiegata, con un migliore sincronismo nelle fermentazioni di carboidrati e proteine, che si accompagnano a minori perdite azotate.

Questo migliore sincronismo nell'utilizzazione di carboidrati e proteine nel cieco, che si traduce in una maggiore sintesi microbica può, a sua volta, far ipotizzare che una maggiore sintesi di biomassa batterica nel gruppo MOS rispetto agli altri due gruppi. Entrambe queste ipotesi sono suffragate dalle osservazioni in vitro di Bovera *et al.* (2010b) condotte su contenuti cecali di conigli alimentati con MOS alla dose di 1 g/kg.

Deve essere osservato, tuttavia, che i valori di ammoniaca ritrovati nel contenuto cecale dei vari gruppi di conigli rientra nella norma se si considera che la concentrazione cecale di ammoniaca in conigli alimentati con diete bilanciate è compreso tra 4 e 6 mmol/l (Fraga, 1998). In ogni caso, il più elevato valore di BCP nei conigli del gruppo MOS non corrisponde ad una più elevata digeribilità delle proteine. Noi riteniamo che l'ipotizzata maggiore produzione di biomassa microbica registrata nel gruppo MOS, non accompagnata da un più elevato numero di unità formanti colonia dei batteri cecali, potrebbe indicare un maggiore turnover microbico nel contenuto cecale dei conigli alimentati con i MOS.

Un più elevato contenuto di azoto di origine batterica presente nelle feci potrebbe influenzare il contenuto di proteine grezze misurate nelle feci e, di conseguenza, influenzare i dati relativi

ai coefficienti di digeribilità apparente. Sfortunatamente, non è stato possibile stimare la proporzione di azoto endogeno nelle feci dei conigli in prova.

La differenza nelle attività di fermentazione cecale tra i gruppi MOS e ANT è, a nostro avviso da imputare ad una diversa selezione batterica dovuta proprio alle modalità di azione dei due principi attivi. Gli antibiotici, infatti, possono migliorare lo stato sanitario dell'apparato digerente riducendo le infezioni subcliniche attraverso l'uccisione dei batteri. Tuttavia quando si usano antibiotici a largo spettro, come nel nostro caso, l'effetto negativo può coinvolgere anche batteri saprofiti (Kocher, 2006). I MOS invece agiscono legando i recettori presenti sulle fimbrie di tipo 1 di alcuni patogeni riducendo il loro attacco alla mucosa intestinale e migliorando quindi l'ambiente enterico per i batteri endogeni (Griggs e Jacob, 2005).

I mannanoligosaccaridi hanno mostrato un effetto simile agli antibiotici nella riduzione del numero delle colonie di coliformi. Anche Ozduven *et al.* (2009) trovarono che l'aggiunta di MOS a 2 g/kg alle diete di broiler riduce significativamente la conta cecale di coliformi nel confronto con il gruppo controllo. Anche se le differenze non risultano statisticamente significative (probabilmente a causa dell'elevata variabilità dei risultati) il contenuto cecale dei conigli del gruppo MOS ha fatto registrare il più elevato numero di anaerobi totali.

6. CONCLUSIONI

Gli antibiotici, nel confronto con gli altri due gruppi determinano una riduzione delle fermentazioni batteriche a carico dei carboidrati di struttura e di riserva anche se le fermentazioni di fonti carboniose e proteiche appaiono ben sincronizzate.

I MOS sono in grado di implementare le fermentazioni della parete cellulare, con particolare riferimento alla cellulosa, e, inoltre, garantiscono un buon sincronismo nelle fermentazioni cecali riducendo la presenza di ammoniaca nel contenuto del cieco.

Stando a queste considerazioni, i MOS, usati ad una concentrazione di 1g/kg di dieta, possono essere utilizzati come alternativa agli antibiotici in conigli fase di accrescimento, in quanto apportano effetti positivi sul peso corporeo, sulla digeribilità dei nutrienti e sull'attività fermentativa della popolazione microbica cecale

7.BIBLIOGRAFIA

Association of Official Analytical Chemists (2004). Official methods of analysis, 2 vol., 18th edition. AOAC, Arlington, VA, USA.

Bovera, F.; D'Urso, S.; Calabro', S.; Tudisco, R.; Di Meo, C.; Nizza, A., 2007: Use of faeces as an alternative inoculum to caecal content to study in vitro feed digestibility in domesticated ostriches (*Struthio camelus* var. domesticus). *British Poultry Science* 48, 354–362.

Bovera, F.; Nizza S.; Marono, S.; Maliardo, K.; Piccolo, G.; Tudisco, R.; de Martino, L.; Nizza A., 2010a: Effect of mannanoligosaccharides on rabbit performance, digestibility and rectal bacterial anaerobic populations during an episode of epizootic rabbit enteropathy. *World Rabbit Science* 18, 9 – 16

Bovera, F.; Marono, S.; Di Meo, C.; Piccolo, G.; Iannaccone, F.; Nizza, A., 2010b: Effect of mannanoligosaccharides supplementation on caecal microbial activity of rabbits. *Animal*, 9, 1522-1527.

Forsythe S.J., Parker D.S. (1985). Ammonia-nitrogen turnover in the rabbit caecum and exchange with plasma urea-N. *Br. J. Nutr.* 54: 285-292.

Fraga, M..J., 1998: Protein digestion. In: *The nutrition of the rabbit*. Ed. De Blas C., Wiseman J. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK, 39-53.

Gidenne, T.; Carabano, R.; Garcia, J.; de Blas, C., 1998: Fibre digestion. In: *The nutrition of the rabbit*. Ed. De Blas C., Wiseman J. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK, 69-88.

Griggs, J.P.; Jacob, J.P., 2005: Alternatives to antibiotics for organic poultry production. *Journal of Applied Poultry Research* 14, 750–756.

Knutson R.S., Francis R.S., Hall J.L., Moore B.H., Heisinger J.F. (1977). Ammonia and urea distribution and urease activity in the gastro-intestinal tract of rabbits (*Oryctolagus* and *Sylvilagus*). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 58A: 151-154.

Kocher A. (2006). Interfacing gut health and nutrition: the use of dietary pre- and probiotics to maximise growth performance in pigs and poultry. In D. Barug, J. de Jong, A.K. Kies, M. W.A. Verstegen (Eds.) *Antimicrobial Growth Promoters*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 289-310.

Ozduven, M.L.; Samli, H.E.; Okur, A.A.; Koc, F.; Akyurek, H.; Senkoylu, N., 2009. Effect of mannanoligosaccharide and/or organic acid mixture on performance, blood parameters and intestinal microbiota of broiler chicks. *Italian Journal of Animal Science* 8: 595-602.

SAS/STAT Users Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Searle PL (1984). The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen. A review. *Analyst* 109, 549–568.

Van Soest PJ (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd ed. Ithaca, NY: Comstock Publishing Associates, pp. 354–370

Van Soest, P.J., 1993: Cell wall matrix interactions and degradation – Session synopsis. In *Forage cell wall structure and digestibility* (ed. HG Jung, DR Buxton, RD Hatfield and J Ralph), 377. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.

Vernay, M., 1987: Origin and utilisation of volatile fatty acids and lactate in the rabbit: influence of the faecal excretion pattern. *British Journal of Nutrition* 57, 371-381.

Vialard V. (1984). Endogenous urea as nitrogen source for microorganisms of the rabbit digestive tract. *Ann. Nutr. Metab.*, 28: 151-155.

Vogtmann H., Frirter P., Prabuck A.L. (1975). A new method of determining metabolizability of energy and digestibility of fatty acids in broiler diets. *Br. Poult. Sci.* 16: 531-534.

CAPITOLO 7

CONCLUSIONI GENERALI

1.CONCLUSIONI GENERALI

Il periodo intorno allo svezzamento, come già detto nell'introduzione di questa tesi, risulta essere particolarmente delicato per i coniglietti, che si trovano a dover far fronte a forti stress, spesso causa di patologie enteriche che non di rado hanno un esito letale.

La prevenzione di tali patologie, così come la cura, viene effettuata attraverso la somministrazione di antibiotici a scopo profilattico, ma lo smoderato utilizzo di questi farmaci, ha fatto nascere l'esigenza di limitarne l'uso, anche in seguito alla resistenza che batteri patogeni hanno mostrato nei confronti di tali medicinali.

In seguito al divieto sancito dalla Comunità Europea nel 2006, all'utilizzo degli antibiotici come promotori della crescita, è nata l'esigenza di ricercare molecole alternative che potessero sostituire gli antibiotici negli allevamenti zootecnici.

Tra i rimedi alternativi agli antibiotici si annoverano probiotici, prebiotici, enzimi, acidi organici ed estratti vegetali.

Nella presente tesi, sono stati condotti studi sui prebiotici, in particolare i mannanoligosaccaridi, il cui meccanismo di azione si basa su una sorta di esclusione competitiva, in quanto numerosi batteri patogeni intestinali posseggono fimbrie di tipo 1, che sono specifiche per il mannosio e che determinano l'attacco ai mannosio-recettori sulle cellule intestinali. I mannani quindi possono impedire l'associazione mediata da fimbrie di tipo 1 alla mucosa intestinale legandosi alle fimbrie di questi microrganismi.

I risultati ottenuti nelle varie prove sperimentali sopra riportate hanno evidenziato come i MOS possano rappresentare una valida alternativa agli antibiotici durante l'intero ciclo produttivo del coniglio da carne.

Rispetto agli antibiotici, infatti (capitolo 2), non hanno determinato significative modificazioni delle performance in vivo né delle caratteristiche delle carcasse.

Nella prova trattata nel capitolo 3, i MOS si sono dimostrati anche buoni sostituti durante la fase di finissaggio, infatti, oltre a migliorare alcuni parametri in vita (principalmente accrescimento e l'indice di conversione alimentare), hanno mostrato di avere un effetto anche sulla composizione acidica delle carni che hanno presentato un minor contenuto di acidi grassi saturi, senza modificare i parametri rilevati alla macellazione e alla sezionatura delle carcasse e la composizione chimica delle carni stesse.

L'utilizzo di tali oligosaccaridi in seguito ad un episodio di Enterocolite Enzootica (capitolo 4), ci da un'ulteriore conferma sulla validità di queste molecole, che anche in condizioni così

critiche, possono avere un effetto positivo sul tasso di mortalità, sulle performance di accrescimento e sulla digeribilità dei nutrienti.

In seguito a prove in vitro (capitoli 5 e 6), eseguite per valutare l'attività della flora microbica cecale del coniglio, i MOS hanno fatto registrare miglioramento della digeribilità in vitro degli alimenti incubati, nonché una maggiore produzione di acidi grassi volatili a livello del cieco e una più intensa demolizione delle proteine a favore dei microrganismi ciecali che le utilizzano per le proprie biosintesi.

Alla luce dei risultati ottenuti nella presente tesi, si può supporre una sostituzione degli antibiotici con i mannanoligosaccaridi ed il livello che ha dato i migliori risultati rispetto agli altri è quello rappresentato da MOS_1.0 (1g/kg di alimento).

La quantità di studi presenti in letteratura rispetto all'uso di MOS nell'alimentazione del coniglio risulta essere molto scarsa, in particolare se confrontata con quella relativa alle altre specie. Ulteriori studi sono quindi necessari per inquadrare ancora meglio queste molecole nell'alimentazione di un animale che possiede tali particolarità fisiologiche.

Inoltre, bisogna ricordare che gli ingredienti che compongono le diete per conigli sono ricchi in fibra, ed alcuni di essi contengono significative quantità di oligosaccaridi, una possibile alternativa ai prebiotici commerciali che spesso possono risultare molto costosi, può essere rappresentata proprio da una selezione di ingredienti nelle diete che naturalmente contengano quantità tali di oligosaccaridi necessari nelle diverse fasi vitali dei conigli.