

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**



**DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA E PRODUZIONI
ANIMALI**

**Dottorato di Ricerca in
Produzione e Sanità degli Alimenti di Origine Animale
XXV CICLO**

Titolo

**Alternative agli antibiotici nel coniglio in accrescimento: effetti sulle
performance in vivo e sulle caratteristiche delle carcasse e delle carni**

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

Fulvia Bovera

Candidato Dott.

Francesco Iannaccone

Coordinatore

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

Aprile 2013

Sommario

<i>Capitolo 1</i>	5
INTRODUZIONE GENERALE	5
1. INTRODUZIONE	6
2. CENNI DI ANATOMIA E FFFISIOLOGIA DELL'APPARATO DIGERENTE.....	12
2.1. Ciecotrofia.....	13
2.2. Maturazione delle funzioni digestive.....	16
2.3 Maturazione delle funzioni immunitarie.....	19
3. SVEZZAMENTO E RELATIVE PROBLEMATICHE.....	23
3.1. Apporto di amido	24
3.2. Apporto di fibra.....	25
3.3. Apporto di proteine	26
4. IMPIEGO DI ANTIBIOTICI NELL'ALLEVAMENTO ZOOTECNICO	28
5. LE ALTERNATIVE AGLI ANTIBIOTICI	30
5.1. I Probiotici.....	30
5.2 I Prebiotici.....	33
5.3. Tecniche di alimentazione	40
6. BIBLIOGRAFIA	43
7. SCOPO DELLA TESI	65
8. AZIENDA AGRICOLA MARCIANO ROSA CARMELA	66
<i>Capitolo 2</i>	69
EFFETTO DELL'IMPIEGO DI MANNANOLIGOSACCARIDI SULLE PERFORMANCE IN VIVO, SULLA DIGERIBILITA' DEI NUTRIENTI E SULLE CARATTERISTICHE DEL CONTENUTO CIECALE DI CONIGLI IN FASE DI ACCRESCIMENTO	69
1. OBIETTIVO DELLA RICERCA.....	70
2. MATERIALI E METODI	70
2.1. Disegno sperimentale.....	70
2.2. Diete	70
2.3. Rilievi ed analisi effettuate	71
2.4. Analisi chimiche	72
3. ANALISI STATISTICA	73
4. RISULTATI	73
5. DISCUSSIONE.....	78
6. CONCLUSIONI	81

7.BIBLIOGRAFIA	82
<i>Capitolo 3</i>	<i>84</i>
<i>UTILIZZO DI DIETE CON L'AGGIUNTA DI MOS DURANTE IL PERIODO DI FINISSAGGIO DEL CONIGLIO: EFFETTI SULLE PERFORMANCE DI ACCRESCIMENTO, SULLA DIGERIBILITÀ DEI NUTRIENTI E SULLA QUALITÀ DELLE CARCASSE E DELLE CARNI</i>	<i>84</i>
1. INTRODUZIONE	85
1.1. Qualità della carne di coniglio	85
2. OBIETTIVO DELLA RICERCA	86
3. MATERIALE E METODI	86
3.1. Disegno sperimentale	86
3.3. Rilievi effettuati nel corso della prova	88
3.4. Caratteristiche fisiche	89
3.5. Analisi chimiche	90
4. ANALISI STATISTICA	91
5. RISULTATI	92
5.1. Performance di accrescimento	92
5.2. Digeribilità dei nutrienti	93
5.3. Caratteristiche della carcassa	94
5.4. Caratteristiche fisiche della carne, contenuto di collagene e solubilità	95
5.5. Composizione chimica e perdite di scongelamento della carne	97
5.6. Profilo acidico dei grassi della carne	98
6. DISCUSSIONE	101
7. CONCLUSIONI	104
8. BIBLIOGRAFIA	105
<i>Capitolo 4</i>	<i>111</i>
<i>EFFETTO DELL'APPLICAZIONE MEDIANTE SPRAIZZAZIONE DI LACTOBACILLUS PLANTARUM, SULLE PERFORMANCE DI ACCRESCIMENTO, SULLE FERMENTAZIONI CIECALI E SU ALCUNI PARAMETRI EMATOLOGICI DI CONIGLIETTI DURANTE LA FASE DI ALLATTAMENTO</i>	<i>111</i>
1. INTRODUZIONE	112
2. OBIETTIVO DELLA RICERCA	113
3. MATERIALI E METODI	113
3.1. Disegno sperimentale	113
3.2. Performance di accrescimento in vivo	114
3.3. Analisi chimica delle diete	115
3.4. Analisi microbiologica	115
3.5. Fermentazioni ciecali	115
3.6. Parametri ematologici	116

4.ANALISI STATISTICA	116
5.RISULTATI.....	117
6. DISCUSSIONE.....	121
7.CONCLUSIONI	123
8.BIBLIOGRAFIA	124

Capitolo 5 128

EFFETTO DELLA RESTRIZIONE IDRICA SULLE PERFORMANCE DI ACCRESCIMENTO, SULLA DIGERIBILITA' DEI NUTRIENTI DELLA DIETA SULLE CARATTERISTICHE DI FERMENTAZIONE CIECALE E SU ALCUNE CARATTERISTICHE DELLE CARCASSE E DELLE CARNI DI CONIGLIO 128

1.OBIETTIVO DEL LAVORO.....	129
2.MATERIALI E METODI	129
2.1.Criteri fisici	131
2.2.Criteri chimici	132
3.ANALISI STATISTICA	133
4.RISULTATI.....	133
6.DISCUSSIONE.....	142
7.CONCLUSIONI	146
8.BIBLIOGRAFIA	147
9. CONCLUSIONI GENERALI.....	151

Capitolo 1.

INTRODUZIONE GENERALE

1.INTRODUZIONE

Sin dall'antichità l'allevamento del coniglio ha fatto parte del tessuto produttivo delle aree agricole italiane come allevamento di animali destinati a un consumo familiare. A partire dagli anni '60 l'allevamento si è progressivamente modificato perdendo i caratteri di ruralità ed entrando in un contesto di attività zootecnica intensiva.

Questa trasformazione dell'allevamento del coniglio risponde alle esigenze di un mondo industrializzato e fortemente urbanizzato in cui i cittadini hanno un fabbisogno carneo crescente impossibile da coprire con la sola carne bovina. Da questo punto di vista, la carne di coniglio sembrerebbe essere tra quelle ideali, se si considera la brevità del ciclo produttivo, il buon indice di conversione alimentare e la buona qualità del prodotto finale. Stessi requisiti, tra l'altro, possiede la carne del pollo, animale per il quale soltanto pochi anni prima rispetto al coniglio, si era verificato lo stesso processo di trasformazione della struttura e della organizzazione degli allevamenti che aveva consentito una diffusione capillare del consumo di proteine animali.

Il coniglio è quindi uscito dalla "bassa corte" e sono nate aziende specializzate, di consistenza più o meno ampia, ma comunque basate su sistemi e tecniche mirate al suo sfruttamento intensivo, ai fini della produzione di carne.

Sono anche altri i motivi che giustificano l'interesse per questa specie: la sua elevata prolificità, la buona utilizzazione dei foraggi e delle proteine contenute in alimenti ricchi di fibra, la capacità di fissare il 20% delle proteine alimentari sotto forma di carne commestibile, considerando anche l'alimento consumato dai riproduttori. Tra le altre specie solo il pollo da carne fornisce un miglior rendimento proteico (22-23%), mentre per il suino il valore si attesta sul 16-18% e per il bovino sull'8-12%. Il costo energetico, espresso in kcal alimentari necessarie per produrre 1 g di carne, è ancora più vantaggioso, considerata la più elevata produttività dei conigli rispetto, ad esempio, a ovini e bovini (105 kcal/g coniglio; 427 ovini da carne; 442 bovini).

Un altro punto a favore del coniglio è la bassa competitività con l'uomo per le fonti alimentari, dal momento che la razione può essere costituita per oltre 1/3 da farina di erba medica; pertanto la produzione di carne di coniglio può essere interessante anche per quei Paesi che devono importare cereali.

É così che dal 1970 ad oggi la produzione nazionale annua di carne di coniglio è cresciuta notevolmente con conseguente aumento dei consumi procapite annuali nel nostro Paese.

Tuttavia, bisogna sottolineare come le statistiche relative alla produzione e ai consumi di carne di coniglio nel nostro Paese presentino ampie variazioni a seconda della fonte bibliografica consultata.

Molto confortanti sono le ultime stime della FAO (2012), secondo le quali l'Italia è al secondo posto a livello mondiale per la produzione di carne cunicola, subito dopo la Cina (Tabella 1) e detiene il primato europeo con il 40% della produzione comunitaria, con un'esportazione pari a 4.200 t (Maniero, 2008) e con un grado di auto approvvigionamento che supera il 90%, stimato addirittura dagli ultimi dati della FAO (2012) pari al 99 %.

Tabella 1. Produzione di carne cunicola nel mondo (FAO, 2012)

Paese	Tonnellate
Cina	669000
Italia	255400
Venezuela	254300
Corea	133.900
Egitto	69.840
Spagna	66.200
Francia	51.665
Repubblica Ceca	378000
Germania	37.500
Resto del mondo	117.417
Totale	1.693.022

Sempre secondo le stime della FAO, reperibili sul sito www.fao.org, la coniglicoltura assume, nel nostro Paese, una posizione di rilievo, rappresentando il 9% della Produzione Lorda Vendibile dell'intero comparto zootecnico da carne e ponendosi al quarto posto dopo la produzione di carne suina, avicola e bovina (Tabella 2).

Tabella 2. Statistiche zootecnia italiana da carne nel 2010 (FAO STAT 2012).

	Produzione (t)	Consumo Individuale (kg/pro-capite)	Livello di Auto approvvigionamento (%)
Carni suine	1.588.4460	31	67
Carni avicole	1.1274.000	18	106
Carni bovine	1.055.010	23	63
Carni cunicole	255.400	4	99

Questi confortanti dati presentati dalla FAO appaiono però in netto contrasto con i risultati delle indagini dell'ISTAT sulla produzione cunicola nel nostro Paese. In Tabella 3 si riporta l'andamento dei dati relativi alla macellazione di conigli nell'ultimo decennio. Come si può osservare, la macellazione dei conigli ha mostrato una leggera, ma costante crescita fino al 2007. Dopodiché, complice anche l'incipiente crisi economica, si è assistito ad un forte calo della produzione che è proseguita fino al 2010, ultimo anno per il quale sono attualmente disponibili dati dall'ISTAT.

Tabella 3. Conigli macellati (peso morto in migliaia di quintali) registrati dal 2001 al 2010 (Fonte: ISTAT, 2013).

Anno	Peso morto conigli
2001	2.499
2002	2.521
2003	2.483
2004	2.888
2005	3.018
2006	2.970
2007	3.099
2008	1.825
2009	1.695
2010	1.674

D'altra parte, i risultati dell'ultimo censimento dell'agricoltura, pubblicati nel gennaio 2013, indicano pari a 3.772.937, di cui 478.507 fattrici, il numero di conigli allevati in Italia nel 2010. Considerando come veritieri questi ultimi dati, il numero di conigli allevati in Italia per la produzione di carne sarebbe pari a 3.294.430. Poiché si tratta di un dato scaturito da un censimento (quindi una fotografia della realtà cunicola in uno specifico momento), è necessario moltiplicare per 5 tale numero per risalire alla effettiva produzione annuale. Fatto ciò, e moltiplicando per 1.6 kg (quantità di carne ricavabile mediamente da ogni animale macellato) si arriva ad una produzione di carne pari a 26.355 tonnellate circa, ben lontani dalla quantità stimata della FAO.

Anche l'AVITALIA (Unione nazionale Produttori Avicunicoli) ha condotto qualche anno fa (nel 2007) un'indagine sulla produzione di carne cunicola nel nostro Paese. I risultati apparivano più confortanti rispetto ai dati rilevati dall'ISTAT, riportando un numero di conigli macellati pari a 67.500.000 circa, cui corrispondono 44.000 tonnellate di carne prodotta. Sebbene i dati siano più

favorevoli, è bene ricordare che si tratta di numeri riferiti al 2007 che senza dubbio hanno risentito del forte calo produttivo degli ultimi anni ma, ancora una volta, contribuiscono a prendere con le pinze le stime fornite dalla FAO.

Certamente, ai rilievi dell'ISTAT e dell'AVITALIA va aggiunta quella fetta di produzione che sfugge alle rilevazioni statistiche, in quanto vengono escluse una serie di aziende con numero limitato di capi che, generalmente, praticano l'allevamento del coniglio come attività secondaria, o part-time, prevalentemente destinata all'auto-consumo.

Per l'assenza di rilevazioni ufficiali costanti nel tempo, la determinazione dei consumi procapite della carne di coniglio richiede una specificazione. In primo luogo bisogna osservare come le statistiche ufficiali ISTAT hanno sempre riportato insieme i consumi di carne di coniglio e di selvaggina. In termini pro-capite le quantità consumate di selvaggina e coniglio sono state, nell'ultimo decennio, tendenzialmente costanti, oscillanti dai 4,2 ai 4,7 kg/pro-capite. L'analisi diretta del solo consumo di carne di coniglio si è resa disponibile solamente dopo che l'ISTAT ha introdotto, nel 2003, una specifica indagine presso le strutture di macellazione, e dopo aver operato una riclassificazione delle sue voci di Contabilità nazionale (2005). E' stato così possibile ricostruire la serie storica dal 2000; i dati derivati da questo lavoro di rettifica condotto dall'ISMEA (Istituto Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare) indicano come il consumo pro-capite, dal 2000, non si sia discostato molto da un valore medio di 2,6 kg/procapite (Tabella 4).

Tabella 4. Andamento dei consumi di carne cunicola (kg/pro capite) (Fonte: Elaborazione ISMEA su dati ISTAT)

Anni	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Consumo	2.5	2.7	2.6	2.6	2.7	2.8	2.7	2.8	2.6

I dati del 2009 e del 2010 fanno registrare una flessione di circa l'8 %, attestandosi su poco meno di 2.4 kg procapite. Tra le regioni italiane, la Campania fa registrare consumi quasi doppi rispetto alla media nazionale, da imputare al notevole consumo nell'isola d'Ischia dove il coniglio è un piatto tipico, molto richiesto dai turisti.

In definitiva, il settore cunicolo sta attraversando in Italia un periodo di crisi piuttosto importante che ha come conseguenza la chiusura di molte aziende piccole e medie. Le motivazioni di questa crisi vanno ricercate prima di tutto nella mancanza di un'organizzazione produttiva razionale del settore, come si verifica nell'allevamento del pollo. Il produttore vende i propri conigli direttamente al macello con delle quotazioni che variano molto non solo di anno in anno, ma anche nei diversi

periodi dell'anno con punte massime (oltre i 2.00 €/kg peso vivo) che vengono raggiunte durante i periodi di importanti festività religiose (Natale e Pasqua) e punte minime (anche meno di 0.80 €/kg peso vivo) durante il periodo estivo (fatta eccezione per la Campania). A ciò va aggiunto che i costi di produzione sono piuttosto elevati raggiungendo valori medi di 1.80€/kg peso vivo, tenendo anche in considerazione le quote di ammortamento di attrezzature e ricoveri. Di conseguenza, la mancanza di un sistema di produzione simile a quello del pollo da carne, non tutela l'allevatore dalle ampie oscillazioni dei prezzi e non lo mette quindi al riparo dalle insidie del mercato.

Accanto a tutto ciò, bisogna anche considerare che la carne di coniglio, per quanto dotata di eccezionali proprietà nutrizionali, non incontra il favore dei consumatori per una serie di problematiche che possiamo così riassumere:

- 1) Modalità di presentazione della carcassa in macelleria (carcasse vendute intere con testa attaccata);
- 2) Mancanza di prodotti porzionati o trasformati (questo da imputare alla qualità del grasso dell'animale, ricco di acidi grassi polinsaturi, positivi per la salute del consumatore, ma suscettibili di alterazione in corso di manipolazione – irrancidimento da calore o esposizione alla luce);
- 3) Considerazione del coniglio come un animale da compagnia, soprattutto tra le nuove generazioni.

Nonostante tutte queste problematiche, 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 e degli anziani.

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 che rappresenta il 32% di quella nazionale nazionale (ISTAT, 2010).

La Campania è la più importante realtà, come numero di allevamenti, del Sud Italia con un numero di capi allevati pari all'8% della realtà nazionale. Il peso vivo di vendita alla macellazione oscilla fra i 2,2 e i 3,0 kg a seconda delle regioni, con valori medi che si aggirano sui 2,5 kg, e un peso

medio della carcassa di 1,6kg. Questi pesi sono più elevati che negli altri 10 Paesi europei dove il coniglio è allevato, tutto questo è imposto da cicli produttivi più lunghi, 75-85 giorni, contro i 60-70 giorni di Francia e Spagna dove il consumatore preferisce carcasse più leggere circa 2 kg di peso vivo.

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 strumentale.

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 FFISSIONOLOGIA 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).

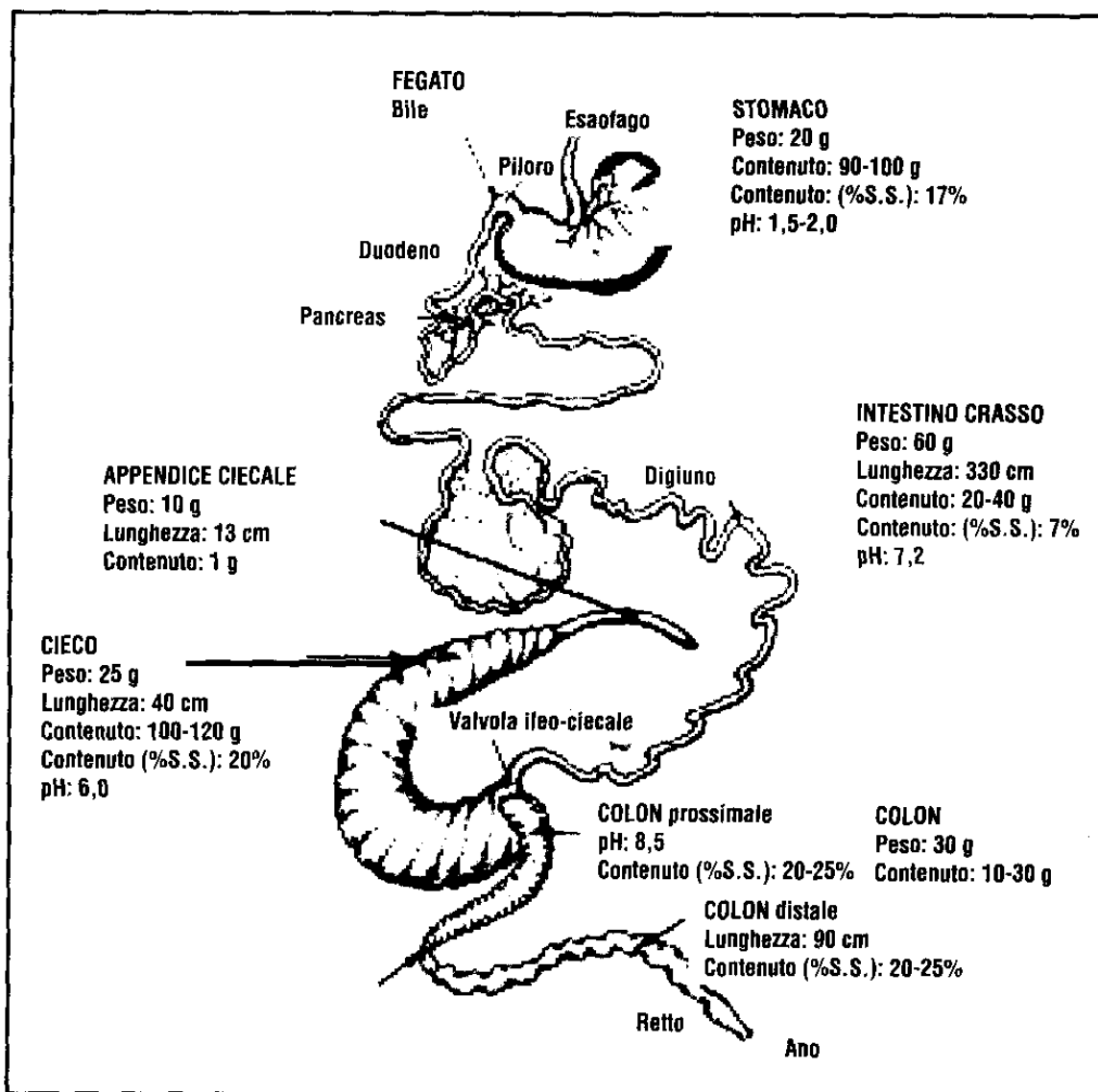


Figura 1 – Apparato digerente del coniglio adulto (Lebas et al., 1997)

Il primo importante compartimento dell'apparato digerente del coniglio è lo stomaco, il quale è rivestito da un sottile strato muscolare ed è quasi sempre 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 di questo tratto dell'apparato digerente 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 cecale) 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 prime 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).

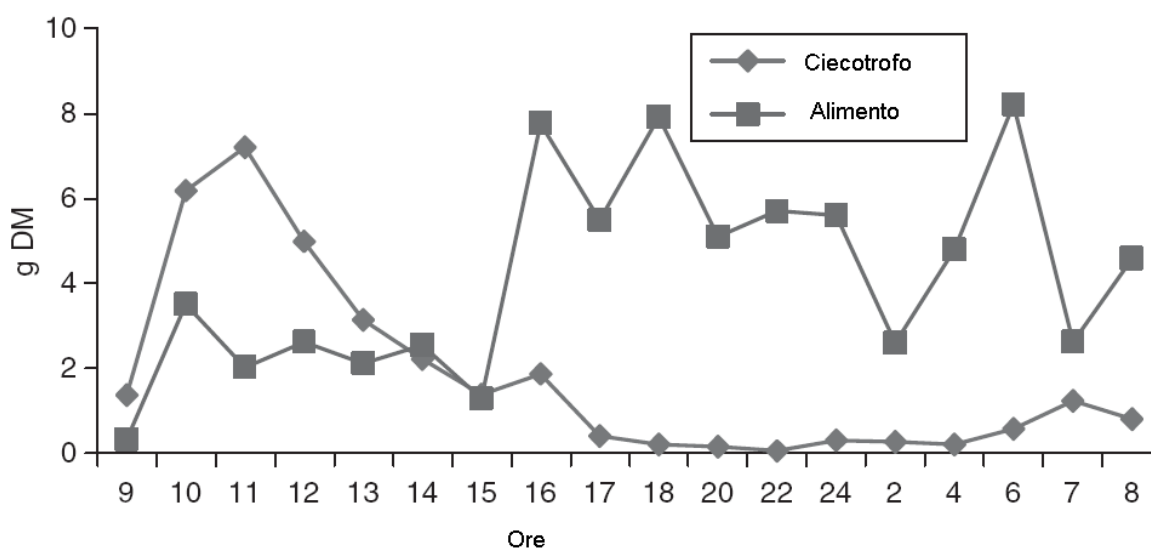


Figura 2 – Escrezione delle feci dure e molli e ingestione della sostanza secca durante il giorno (Carabaño e Merino, 1996)

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 settimane di età) la produzione di feci morbide aumenta con l'età raggiungendo il massimo livello a 63 - 77 giorni.

La formazione del ciecotrofo avviene in seguito ad una separazione di tipo meccanico attuata nel cieco (Figura 3), il quale attraverso delle contrazioni, spinge il suo contenuto verso il colon che funge da organo selezionatore, poiché con movimenti peristaltici convoglia il materiale grossolano

Tabella 5 – Composizione chimica del contenuto ciecale, ciecotrofo e feci (valori medi espressi in % sulla sostanza secca).

	CONTENUTO	CIECOTROFO	FECI
	CECALE		
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.

A partire dalla metà della terza settimana di vita, i coniglietti cominciano a consumare anche alimenti solidi con conseguente riduzione graduale dell'assunzione di latte materno.

Durante questa fase della vita, il cieco ed il colon si sviluppano maggiormente 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).

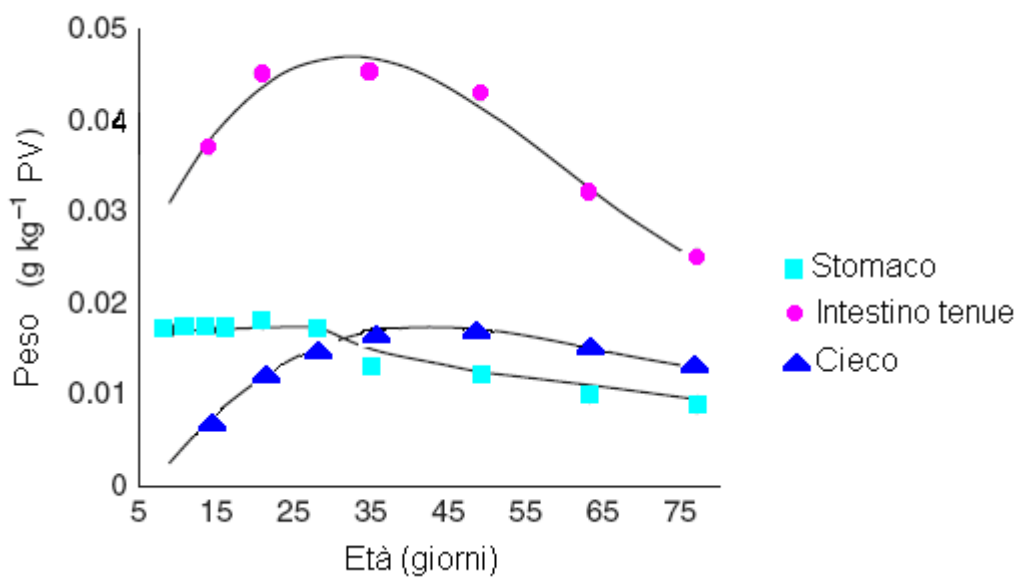


Figura 4: Peso relativo di ciascun tratto del digerente vuoto rispetto al peso corporeo (Le Bas e Laplace, 1972; García Rebollar *et al.*, 2004; Galloise *et al.*, 2005).

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), va incontro a profonde modificazioni morfologiche durante le settimane che seguono la nascita e la sua

maturazione istologica si completa non prima del ventesimo giorno di età (Toofanian e Targowsky, 1982).

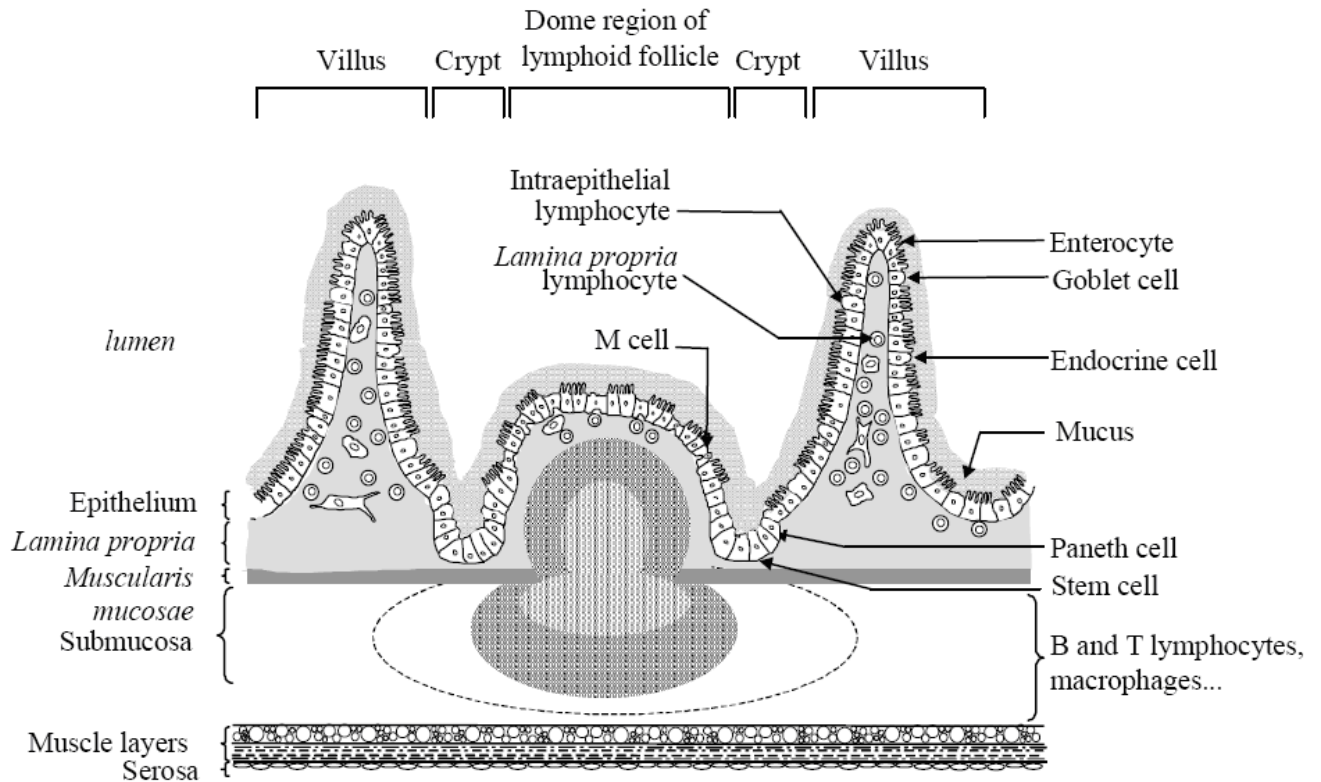


Figura 5: Organizzazione della mucosa digestiva del coniglio comprensiva dell'epitelio (enterociti, cellule Goblet e paneth cells) e del tessuto linfoide associato (follicoli linfoidi e cellule diffuse nella lamina propria o nell'epitelio).

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).

Nei primi 18 giorni di vita, periodo in cui i coniglietti 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 hanno raggiunto ancora i livelli riscontrabili in 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, dopodichè inizia ad aumentare l'attività di altri enzimi quali, saccarasi e maltasi; tali attività enzimatiche raggiungono 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 (la cui attività si accresce a partire dai 7 giorni di età per stabilizzarsi dopo i 90 giorni, Bernadac *et al.*, 1991; Dojana *et al.*, 1998); l'attività proteolitica tende a stabilizzarsi 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 (nell'ordine, acetico, butirrico e propionico), 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 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 intestinale (GALT, tessuto linfoide associato alla mucosa intestinale), 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 divide in due forme distinte (Carabano *et al.*, 2008):

- forma organizzata: follicoli linfoidi, distribuiti nelle cosiddette placche del Peyer, nell'appendice ciecale (Mage, 1998), e nel *sacculus rotundus*;
- forma diffusa: localizzata 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^o settimana 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 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

Nel normale ciclo produttivo del coniglio, lo svezzamento viene praticato tra i 28 e i 35 giorni di età. È questo un momento estremamente delicato in cui i giovani coniglietti vengono sottoposti a forti stress di tipo individuale, ambientale ed alimentare.

In generale, i coniglietti iniziano ad uscire dal nido e quindi ad ingerire il mangime presente nella gabbia fattrice, tra i 18 e i 21 giorni di età. Tuttavia, finché la madre è presente nella gabbia, il latte resta la principale fonte di nutrienti. Di conseguenza, quando i piccoli vengono separati dalla fattrice si ha il passaggio da un'alimentazione quasi esclusivamente lattea (ricca in proteine animali e grassi e povera di carboidrati), 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), potendo arrivare ad una insufficiente copertura dei fabbisogni dell'animale, sia per la crescita che per lo sviluppo dell'apparato digerente 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 GALT risultano essere ancora non completamente maturi.

La risposta dell'animale a tutte queste variazioni è spesso una "superingestione" di alimento solido che 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 e 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.

A queste patologie va aggiunta la Enterite Enzootica del coniglio che attualmente viene considerata la principale causa di mortalità dei coniglietti nelle aziende cunicole europee (Dewree et al., 2003). L'Enterite Enzootica è un'enteropatia complessa, di gravità elevata, che può portare la mortalità nelle due settimane che seguono lo svezzamento fino a punte del 70 %, con morbilità che raggiunge il 100% (Pérez de Rozas e coll., 2005). Non è stato possibile identificare un agente patogeno specifico (Licois et al., 2000; Marlier et al., 2006; Szalo et al., 2007; Huybens et al., 2009) per cui si parla di un'enteropatia ad eziologia multifattoriale con la concorrenza di un patogeno specifico (il *Clostridium perfringens*) e di molti altri fattori ambientali (igiene delle strutture di allevamento, condizioni di temperatura e umidità, ecc.). L'enterite enzootica può essere controllata con l'impiego di una premedicazione antibiotica.

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 proteine (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 una modificazione 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 glucidiche utilizzate. 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).

In bibliografia esiste qualche lavoro relativo all'effetto dei livelli 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 dell'enterite enzootica, 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).

C'è da dire, però, che un 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 aminoacidi. 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).

* * *

Dalla disamina effettuata, appare quindi evidente come sia una necessità profondamente sentita dagli allevatori di conigli utilizzare sostanze ad attività antibatterica che possano migliorare lo stato sanitario dell'apparato digerente nei coniglietti, soprattutto nel periodo intorno allo svezzamento. Fino ad oggi, la premedicazione antibiotica è stata in assoluto la via più utilizzata, ma da qualche anno a questa parte, sono richiesti cambiamenti radicali da questo punto di vista. Nei capitoli successivi vedremo che ruolo hanno avuto gli antibiotici, come è cambiata la normativa e quali sono le alternative attualmente possibili.

4. IMPIEGO DI ANTIBIOTICI NELL'ALLEVAMENTO ZOOTECNICO

La scoperta dell'attività degli antibiotici come promotori della crescita risale a circa la metà del secolo scorso quando Stokstad and Jukes (1949) somministrarono ai pulcini i prodotti della fermentazione del batterio *Streptomyces aureofaciens*. La ricerca aveva lo scopo di fornire agli animali una fonte di vitamina B12, ma la conseguenza fu una stimolazione della crescita talmente evidente rispetto al gruppo controllo, da non poter essere spiegata soltanto con un più adeguato apporto vitaminico.

Nel giro di poco tempo si scoprì che la causa delle migliori performance di accrescimento dei polli risiedevano nell'attività antibiotica dei residui prodotti della fermentazione. Questa scoperta fu rapidamente estesa ad altri antibiotici e ad altre specie animali, rendendo sempre più diffuso l'uso di antibiotici a dosi subterapeutiche quali promotori della crescita. Nell'ultimo decennio, una notevole quantità di antibiotici sono stati usati in produzione animale a scopo terapeutico, ma anche come promotori della crescita.

L'uso profilattico 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 ha anche una discreta azione profilattica.

Nelle specie zootecniche a ciclo breve come, per esempio, conigli e polli, l'impiego di antibiotici avverrà per un periodo breve.

Sebbene numerose ricerche siano state effettuate per studiare il meccanismo d'azione degli antibiotici promotori della crescita, ancora poco 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.

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.

È comunemente assunto che gli antibiotici promotori della crescita aiutino 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.

Tuttavia, l'uso indiscriminato 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 che sono proprio i ceppi patogeni a sviluppare con maggiore frequenza la resistenza patogeni nei confronti degli antibiotici (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". Attualmente si considera che il 70 % dei batteri responsabili di infezioni ospedaliere siano resistenti ad almeno uno degli antibiotici più comunemente utilizzati (WHO, 2011). Diventa quindi necessario controllare il consumo ingiustificato o inappropriato di antibiotici da parte dell'uomo, ma anche fare attenzione alle produzioni zootecniche dove l'uso di antibiotici è, come abbiamo visto, piuttosto frequente potendo causare sia di per sé antibiotico resistenza legata alle modalità d'impiego ma anche determinare la presenza di residui ad attività antibatterica negli alimenti di origine animale (Chen *et al.*, 2005; Roselli *et al.*, 2005).

Tutto ciò ha reso necessario l'intervento della Comunità Europea che, a partire dal 1° gennaio 2006, ha sancito un generale divieto all'uso di antibiotici a dosi subterapeutiche (EC Reg. 1831/2003) nelle produzioni zootecniche.

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 enteropatia enzootica del conigli.

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 coniglicoltura e non solo, a cercare delle molecole che possano essere usate come additivi alimentari ed avere un effetto sovrapponibile a quello degli antibiotici.

5. LE ALTERNATIVE AGLI ANTIBIOTICI

5.1. I 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.

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 che si tratti di esseri umani che di animali (Fuller, 1989; Hamilton, 2003).

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

- esclusione competitiva nei confronti dei 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); qualche autore ha invece osservato risultati negativi sulle performance di accrescimento (Doyle 2001) in seguito all'utilizzo di queste sostanze.

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:

- sicurezza;
- 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 maiali 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.

Va anche considerato che nel coniglio l'uso di probiotici è spesso difficoltoso considerato il basso pH gastrico dell'animale dopo lo svezzamento.

5.1,2 I Lattobacilli

Classificazione

Il *Lattobacilli* sono batteri Gram-positivi, anaerobi facoltativi o microaerofili, di forma bastoncellare. In natura ne esistono almeno 60 specie e costituiscono la maggior parte del gruppo di batteri lattici, così chiamati in quanto la quasi totalità dei loro membri converte il lattosio e altri zuccheri in acido lattico attraverso la fermentazione lattica. Essi sono molto comuni e di solito non patogeni. Negli esseri umani sono presenti nella vagina e nel tratto gastrointestinale, in cui sono simbiotici e costituiscono una piccola parte del microbiota umano. Per diversi membri del genere è stato ultimato il sequenziamento del genoma.

I lactobacilli producono soprattutto acido lattico per fermentazione degli zuccheri, riducendo il pH dell'ambiente in cui crescono, ma anche acido acetico, etanolo, anidride carbonica ed altri composti secondari. L'acidificazione dell'ambiente in cui vivono ha un ruolo fondamentale nella protezione del sistema gastrointestinale poichè inibisce la crescita di alcuni microrganismi patogeni.

I lactobacilli sono distinti in *omofermentativi*, nel caso producano quasi esclusivamente acido lattico (oltre il 90% dei prodotti di fermentazione), oppure *eterofermentativi*, responsabili in questo caso della fermentazione eterolattica, con secrezioni composte per circa il 50% di acido lattico e 50% di altre sostanze. Durante la fermentazione, la competizione tra questi diversi ceppi di lactobacilli determina in sostanza il contenuto prevalente in acido lattico. Molti lactobacilli sono aerotolleranti a dispetto della completa assenza di catene respiratorie.

In relazione al metabolismo, le specie di *Lactobacillus* possono essere divise in tre gruppi:

- Omofermentativi obbligati (Gruppo I)
 - *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. salivarius*
- Eterofermentativi Facoltativi (Gruppo II)
 - *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sakei*
- Eterofermentativi obbligati (Gruppo III)
 - *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. reuteri*

Utilizzo in campo umano e animale

I Lattobacilli sono riconosciuti come probiotici, capaci di migliorare lo stato sanitario dei loro ospiti dopo somministrazione orale e parenterale (de Waard et al, 2001; Oyetayo et al., 2003). Alcuni dei loro benefici includono la prevenzione di infezioni intestinali (Tannock, 1983; Casas e Dobrogosz, 2000), il controllo del colesterolo sierico (Bertazzoni et al., 2001), il rafforzamento delle difese immunitarie (Aattouri et al., 2001) nell'uomo e nei ratti, il miglioramento dell'accrescimento nei suini e nel pollame (Baird, 1977; Chang et al, 2001).

Le azioni benefiche di questi microrganismi sull'ospite possono variare tra le specie e persino tra ceppi appartenenti alla stessa specie.

I batteri lattici probiotici vengono commercializzati sotto forma di colture liofilizzate di ceppi appositamente selezionati. Si somministrano per via alimentare e, migliorando l'equilibrio del micro-ecosistema gastroenterico, producono una serie di effetti positivi da un punto di vista sanitario e zootecnico, quantitativi e qualitativi.

I ceppi microbici sono molto differenti tra loro e non forniscono gli stessi risultati, per questo nella Comunità Europea è permesso l'impiego dei soli microrganismi probiotici "approvati" da un apposito Comitato Scientifico comunitario (SCAN) che li ha valutati nei loro aspetti di sicurezza e di efficacia.(Newsletter zootecnica n.50, del 24 maggio 2007)

Meccanismo d'azione

Il meccanismo attraverso il quale questi probiotici influenzano il loro ospite, è migliorare la barriera intestinale. Questo può essere dovuto a una competizione per il sito di adesione con alcuni patogeni, alla produzione di composti inibitori, al riequilibrio della flora microbica e del metabolismo dopo disturbi gastrointestinali (de Waard et al, 2001; FAO / OMS, 2001).

5.2 I Prebiotici

I prebiotici sono un gruppo di composti costituiti da catene carboniose (oligosaccaridi) che non possono essere digeriti nello stomaco dei monogastrici, ma possono essere utilizzati 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
Mannan oligosaccaridi (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
Soia oligosaccaridi	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 alla spiccata acidità dell'ambiente gastrico.

I meccanismi d'azione ipotizzati per i prebiotici sono diversi: in primo luogo rappresentano una fonte di nutrimento per i batteri saprofiti dell'intestino, potenziandone l'attività e migliorando l'ambiente enterico; inoltre, sono capaci di stimolare il sistema immunitario associato alla mucosa intestinale. Alcuni prebiotici hanno la capacità di bloccare i siti di attacco alla mucosa intestinale di alcuni microrganismi patogeni, impedendone l'adesione e quindi la proliferazione. 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 fattore limitante relativamente agli alti costi che i prebiotici hanno.

Tra i prebiotici utilizzati nell'alimentazione del coniglio, Lebas (1996), ha riscontrato, in seguito all'aggiunta di Fruttoligosaccaridi (FOS) al mangime, una risposta positiva sull'indice di conversione alimentare, ma non ha trovato effetti sull'incremento di peso medio giornaliero, mentre Aguilar *et al.* (1996) nello stesso tipo di disegno sperimentale hanno evidenziato una 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 accrescimento.

Morisse *et al.* (1992), con l'aggiunta di FOS alle diete dei conigli hanno riscontrato un incremento nella popolazione di *Escherichia coli* fisiologica, un aumento 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 della 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) riscontrarono precedentemente anche una variazione nella proporzione di butirrato.

5.2,1 I Mannano-oligosaccaridi

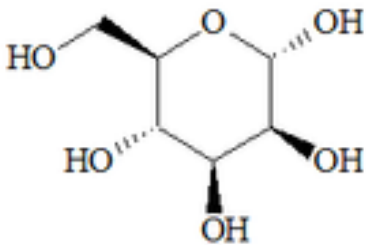
Tra i vari oligosaccaridi, i MOS, derivati dalla parete cellulare di *Saccharomyces cerevisiae*, sono considerate la più promettente alternativa agli antibiotici (Kocher, 2006), e si sono dimostrati in grado di prevenire la colonizzazione della mucosa gastroenterica da parte di batteri patogeni, nonché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

Chimica dei mannano-oligosaccaridi

I mannano-oligosaccaridi fanno parte di complessi glucomannanoproteici presenti nelle pareti cellulari dei lieviti, in particolare di *Saccharomyces cerevisiae*. Nella loro struttura una molecola di mannosio (Figura 1) si ripete numerose volte per formare una catena. Chimicamente, possono essere estratti mediante lisi e centrifugazione delle cellule fungine: ciò permette l'isolamento dei

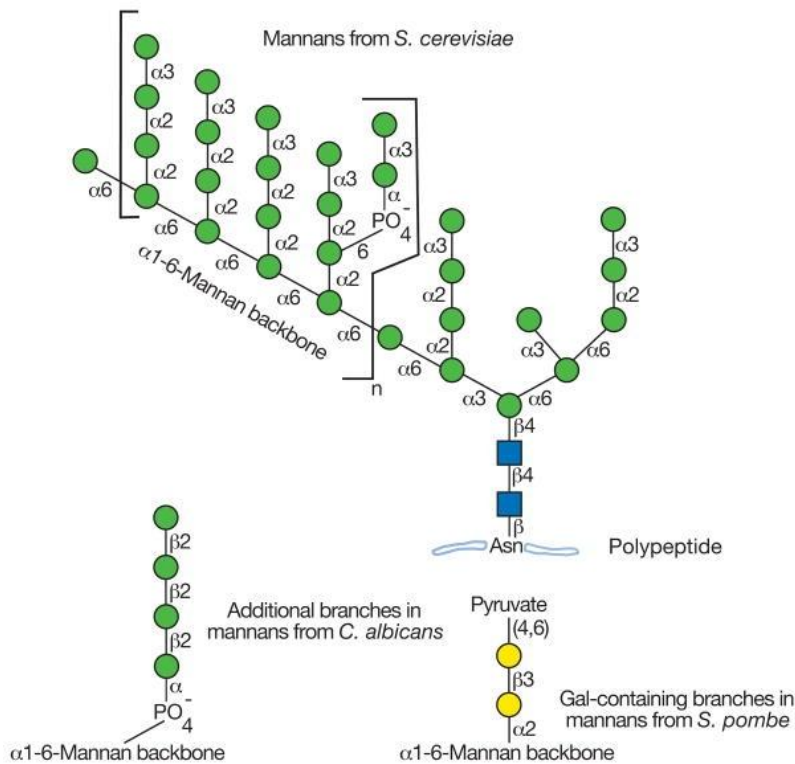
componenti della parete cellulare e quindi la loro separazione. Al termine di questa operazione le molecole che interessano sono opportunamente lavate ed essiccate.

Figura 1. Molecola di mannosio



Nella parete cellulare i mannano-oligosaccaridi sono presenti, quindi, sotto forma di molecole complesse legate ad una porzione proteica. Esistono due principali localizzazioni dei mannano-oligosaccaridi sulla superficie della parete cellulare del *Saccharomyces cerevisiae* (Stewart and Russel, 1998). Essi possono essere legati alle proteine della parete cellulare (Lesage and Bussey, 2006) come parte di -O e -N gruppi glucidici, nonchè possono essere elementi più semplici di lunghi polisaccaridi di α -D-mannosio (Kath et al., 1999), che sono costituiti da ramificazioni α -(1,2)- e α -(1,3)- D-mannosio (da 1 a 5 anelli), legati a loro volta ad una lunga catena α -(1,6)-D-mannosio (Vinogradov et al., 1998) (Figura 2). Questa specifica combinazione di vari elementi funzionali comprende proteine coniugate con mannano-oligosaccaridi altamente idrofile e mannanoligosaccaridi con struttura variabile, simile ad una spazzola che possono adattarsi a vari recettori presenti nel tratto gastrointestinale degli animali (Mansour et al., 2003) e ai recettori presenti sulla superficie delle membrane batteriche (Garofalo et al., 2008). I mannano-oligosaccaridi sotto forma di coniugati proteici sono coinvolti nell'interazione con il sistema immunitario degli animali migliorandone la risposta (Wismar et al., 2010). Essi possono, inoltre, giocare un ruolo chiave nei meccanismi di difesa antiossidanti e antimutageni (Krizcova et al., 2006).

Figura 2. Struttura chimica dei mannani ottenuti dalla parete cellulare del *S. cerevisiae*



Meccanismo d'azione dei MOS

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 influenzano la composizione della microflora intestinale aumentando il numero di *Bifidobacterium* 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.

Storia dei Mannano-oligosaccaridi come supplementi dietetici.

L'ipotesi che i mannano-oligosaccaridi potessero avere un ruolo nel mantenimento di un adeguato stato sanitario dell'apparato digerente degli animali domestici iniziò a formarsi verso la fine degli anni 80 quando diversi gruppi di ricercatori, indipendentemente osservarono la capacità del mannosio, versione pura degli zuccheri complessi dei MOS, di inibire le infezioni da Salmonella nei polli. I vari autori avevano osservato che la Salmonella poteva legare il mannosio attraverso dei recettori presenti sulle fimbrie di tipo 1. Il legame con il mannosio riduceva il rischio della colonizzazione di questi patogeni nel tratto intestinale dei polli (Oyofe et al., 1989a, b, c). Diverse forme di zuccheri simil-mannosio possono interagire con le fimbrie di tipo 1 ma la forma presente nella parete cellulare del *Saccharomyces cerevisiae* (α -1,3 e α -1,6 mannani) è particolarmente efficace nel legare i patogeni (Firon et al., 1987) .

Una serie di studi molto numerosi e riguardanti specie diverse (dai monogastrici ai poligastrici, dai mammiferi agli uccelli) ha stabilito che i MOS sono tra i più importanti ed efficaci additivi naturali per gli animali in produzione zootecnica. L'effetto dei MOS sulle performance degli animali è stato studiato sui polli (Hooge and Danny, 2004a and b; Rosen, 2007a and b), nei suini (Miguel et al., 2004; Rosen 2007c), nei bovini (Newman et al., 1993) e nei conigli (Bovera et al., 2010°, b; Bovera et al., 2012°a, b). In molti casi l'effetto sulle performance di accrescimento degli animali è risultato positivo.

Impiego dei MOS in conigliocultura

La conigliocultura ha subito guardato con interesse i mannanoligosaccaridi data la loro potenzialità di prevenire le ipercolonizzazioni di batteri patogeni e migliorare l'ambiente intestinale, soprattutto nel periodo post-svezzamento (da 28-35 a 56-60 giorni di età). Infatti, la separazione dei coniglietti dalle fattrici causa nei primi un grave stress che si manifesta con una iper-ingestione di alimento solido. Tutto questo si verifica quando l'apparato digerente dei giovani animali non ha ancora raggiunto la piena maturità e spesso, in associazione anche con altri fattori stressanti, si rende responsabile di patologie dell'apparato gastro-intestinale che si manifestano clinicamente con la diarrea e che molto spesso si accompagnano ad elevate mortalità. Da questo punto di vista i MOS appaiono molto interessanti come alternativa agli antibiotici (Kocher, 2006) in quanto sarebbero 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).

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi allo scopo di verificare l'efficacia dei MOS in conigliocoltura nelle diverse fasi del ciclo produttivo per considerarne un'eventuale applicazione come alternativa all'uso spesso irresponsabile di antibiotici. Il punto è anche individuare la giusta quantità da aggiungere alle diete degli animali per ottenere il massimo effetto positivo con l'impiego di una minima quantità di prodotto.

5.3. Tecniche di alimentazione

Accanto alla sostituzione degli antibiotici con altre sostanze che possano in qualche modo svolgere una funzione simile, esiste anche la possibilità di gestire la fase più critica del ciclo produttivo del coniglio (il post-svezzamento) attraverso l'adozione di tecniche di alimentazione ad hoc che cerchino di prevenire i disturbi gastrointestinali tipici del periodo.

Come abbiamo visto nei precedenti capitoli, uno dei problemi più grossi che si verifica nel coniglietto appena svezzato è il cosiddetto stress da superingestione. L'animale, cioè, tenta di compensare il maggiore volume che l'alimento liquido (latte) occupa nel tratto digerente, attraverso una maggiore ingestione di alimento solido. Questa condizione spesso si accompagna o può essere fattore predisponente per l'insorgenza dei problemi gastrointestinali prima descritti. Ecco che la possibilità di ridurre la quantità di alimento ingerita dai coniglietti a partire dal momento dello svezzamento, sembra rappresentare un metodo efficace per il controllo delle enteropatie.

Quando è stata applicata la prima volta nel settore della conigliocoltura, la restrizione alimentare aveva in realtà lo scopo di favorire l'accrescimento degli animali e migliorare l'efficienza dell'apparato digerente (Lebas e Delaveau, 1975; Lebas, 1979).

Tuttavia, dal 2003, più autori, (Lebas, 2007, Gidenne et al., 2009b e 2009c; Martignon et al., 2009) hanno affrontato la relazione che intercorre tra il livello d'ingestione dei conigli in accrescimento e l'incidenza di problemi digestivi, anche in studi dove sono state effettuate infezioni sperimentali (sia ERE o EPEC).

La restrizione alimentare nel post-svezzamento è ormai ampiamente praticata dagli allevatori francesi di conigli (oltre l'85% degli allevatori professionali, Lebas, 2007), con effetti benefici sulla resistenza ai disturbi digestivi e sull'efficienza nutritiva. Varie tipologie di restrizione alimentare nel post-svezzamento sono state studiate nel coniglio, in termini di durata del periodo di restrizione (1-5 settimane) e d'intensità di restrizione alimentare (90% al 40% del consumo volontario). Le tecniche di restrizione sono diverse: restrizione quantitativa, restrizione qualitativa, restrizione idrica. La restrizione qualitativa consiste nella riduzione dell'apporto di un determinato nutriente (p.es. amido)

ed è in genere poco praticata perché difficile da attuare e con risultati non sempre chiari. Molto più semplice è la restrizione quantitativa.

Metodi per limitare l'assunzione di cibo nel post-svezzamento

Varie tecniche sono state studiate per controllare l'assunzione di alimento con due obiettivi principali: il controllo della qualità della carcassa e delle carni (Perrier e Ouhayoun, 1996) e il miglioramento dell'indice di conversione alimentare.. Due sono le principali modalità attraverso cui la restrizione alimentare quantitativa può essere attuata: la prima prevede l'effettiva riduzione della quantità di alimento somministrata agli animali, la seconda la limitazione del consumo dell'acqua di bevanda. La riduzione della quantità di alimento somministrata agli animali è oggi piuttosto semplice da realizzare grazie ai sistemi automatizzati e computerizzati di distribuzione dell'alimento: l'allevatore o chi gestisce l'azienda deve semplicemente impostare la quantità di alimento che il distributore elargirà nell'arco della giornata. Di conseguenza questa tecnica per ottenere la restrizione alimentare viene considerata più precisa e affidabile rispetto alla restrizione idrica. Tuttavia, bisogna considerare che l'ingestione volontaria di alimento si modifica nei coniglietti giorno dopo giorno e che la riduzione impostata dall'allevatore si basa su una stima di quella che l'ingestione dovrebbe essere in funzione dell'età degli animali e del periodo dell'anno. L'altra importante considerazione è che dove i coniglietti sono accasati in gabbie bicellulari è possibile che uno dei due ingerisca più alimento rispetto all'altro.

Un tempo limitato di accesso alla mangiatoia è un modo semplice per limitare l'ingestione e può essere effettuato riducendo le ore di accesso alla mangiatoia durante la giornata, oppure impedendo l'accesso alla mangiatoia in alcuni giorni. Con quest'ultima, è possibile fornire 80% della normale ingestione distribuendo l'alimento per 5 giorni alla settimana, con nessuna somministrazione durante il fine settimana (Lebas e Laplace, 1982). Lo stesso livello d'ingestione (80%) può essere ottenuto con sole 8 h/giorno di accesso alla mangiatoia (Szendro et al, 1988;. Jerome et al, 1998). Queste due modalità di distribuzione sembrano avere differenti effetti sullo sviluppo degli organi digestivi: ad esempio, il peso del fegato è risultato più elevato nei conigli sottoposti a un restrizione intermittente (5 giorni su 7), rispetto a quelli con una restrizione giornaliera(8 h/ giorno). Inoltre, per lo stesso livello di restrizione (70% d'ingestione), lo sviluppo del tratto digestivo ha subito una variazione in funzione della tecnica utilizzata. L'intero tratto digestivo a 67 giorni di età è stato del 12% più pesante (rispetto al gruppo senza nessuna restrizione) quando l'alimentazione è stata distribuita 5 giorni alla settimana, e del 28% più pesante quando la restrizione è stata effettuata quotidianamente (Lebas e Laplace, 1982). Come riportato da Jerome et al. (1998), alimentando gli

animali solo durante il giorno (08:00-18:00 h) l'assunzione di alimento si è ridotta del 20% (121 contro 151 g / giorno per AL), mentre permettere l'accesso alla mangiatoia solo nelle ore notturne ha ridotto il consumo di alimento del 10%. Per ottenere un corretto controllo dell'assunzione nel post-svezzamento, la tecnica più precisa è quella di somministrare una quantità definita di pellet al giorno. Questa quantità può essere somministrata tutta in una volta o in diverse pasti giornalieri. Recenti studi hanno dimostrato che somministrare la razione giornaliera in soli 2 pasti o in 13 pasti (per simulare il comportamento alimentare naturale) porta a effetti simili in termini di miglioramento dello stato di salute, della digeribilità, dell'accrescimento e dell'indice di conversione alimentare (Gidenne et al., 2009b e 2009c; Martignon et al., 2009).

Ridurre il tempo di accesso all'acqua di bevanda non garantisce una precisa riduzione della quantità di alimento ingerita ma è un sistema molto semplice da attuare e che, lasciando l'alimento in mangiatoia sempre presente, non determina forti competizioni tra gli animali.

I primi studi che si occupano di restrizione alimentare limitando l'accesso all'acqua sono di Lebas e Delaveau (1975). Questa tecnica indiretta fa leva sul fatto che l'assunzione di pellet è direttamente correlata al consumo di acqua. Per questo motivo, quando l'accesso all'acqua è stato ridotto a 2 h / giorno l'ingestione di alimento si è ridotta del 18% (Boisot et al., 2004); del 22% con 1 h 30 min di accesso all'acqua (Verdelhan et al., 2004) e del 23% con 1 h di accesso all'acqua (Boisot et al., 2005). Tuttavia, una tale restrizione idrica è discutibile in termini di benessere animale, in particolare in condizioni di temperature elevate (Foubert et al, 2007.; Ben Rayana et al., 2008).

6. 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.

Alexander, F. and A. K. Chowdhury. 1958. Digestion in the rabbit's stomach. Brit. J. Nutr. 12:65.

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.

Aattouri, N., Bouras, M., Tome, D., Marcos, A., Lemonnier, D., 2001. Oral ingestion of lactic acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon production. Brit. J. Nutr. 87:367-373.

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.

Aguilar 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.

Baird, D.M., 1977. Probiotics help boost feed efficiency. Feedstuffs 49:11-12.

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.

Ben Rayana A, Ben Amouda M and Bergaoui R 2008. Effect of water restriction the 9th World Rabbit Congress, June 10–13, 2008, Verona, Italy, pp. 541–545. *Fond. Ini. Zooprofilattiche E Zoot.* publ. Brescia Italy.

Bertazzoni, M.E., Benini, A., Marzotto, M., Hendriks, H., Sbarbati, A., Dellaglio, F., 2001. Preliminary screening of health-promoting properties of new *Lactobacillus* strain: in vitro and in vivo. *HEALFO Eur. Conf. on food and nutrition for better health: highlights from EC research*, Santa Maria Imbaro - Lanciano, Italy.

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.

Boisot P, Duperray J, Dugene' tais X and Guyonvarch A 2004. Interest of hydric restriction times of 2 and 3 h per day to induce feed restriction in growing rabbits. In Proceedings of the 8th World Rabbit Congress (ed. C Becerril and A Pro), pp. 759–764. Colegio de Postgraduados for WRSA, Puebla, Mexico. Retrieved January 30, 2012 from [http://world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/ Congress-2004-Puebla/Puebla-2004-a.htm](http://world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/Congress-2004-Puebla/Puebla-2004-a.htm)

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-oligosaccharides 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.

Bovera F., S. Marono, C. Di Meo, G. Piccolo, F. Iannaccone and A. Nizza Effect of mannanoligosaccharides supplementation on caecal microbial activity of rabbits Animal, 4:9, pp 1522–1527 & The Animal Consortium. (2010a).

Bovera F., Nizza S., Marono S., Mallardo K., Piccolo G.,Tudisco R.,De Martino L., Nizza A. Effect of mannan oligosaccharides on rabbit performance, digestibility and rectal bacterial anaerobic populations during an episode of epizootic rabbit enteropathy. World Rabbit Science, 18: 9 – 16. (2010b)

Bovera F., A. Lestingi, S. Marono, F. Iannaccone, S. Nizza, K. Mallardo, L. de Martino and

A. Tateo.. Effect of dietary mannan-oligosaccharides on in vivo performance, nutrient digestibility and caecal content characteristics of growing rabbits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96 130–136. (2012a)

Bovera F., A. Lestingi, S. Marono, F. Iannaccone, S. Nizza, K. Mallardo, L. de Martino and A. Tateo Effect of dietary mannan-oligosaccharides on in vivo performance, nutrient digestibility and caecal content characteristics of growing rabbits. *Journal of Animal Physiology and animal Nutrition*, 1: 130-136 (2012 b)

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., García-Ruiz A.I., García-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.

Cars O., Diaz Hogberg L., Murray M., Nordberg O., Sivaraman S., Stalsby Lundborg C., So A.D., Tomson G.. Meeting the challenge of antibiotic resistance. British Medical Journal, 337: a1438.(2008)

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.

Casas, I.A., Dobrogosz, W.J., 2000. Validation of the probiotic concept: Lactobacillus reuteri confers broad spectrum protection against disease in humans and animals. Microb. Ecol. Health D. 12:247-285.

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.

Chang, H., Kim, J., Kim, H., Kim, W., Kim, Y., Park, W., 2001. Selection of potential probiotic lactobacillus strain and subsequent in vivo studies. Anton. Leeuw. J. Microb. 80:193-199.

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.

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 Waard, R., Garssen, J., Snel, J., Bokken, G.C.A.M., Sako, T., Huis in 't Veld, J.H.J., Vos, J.G., 2001. Enhanced antigen-specific delayed-typed hypersensitivity and immunoglobulin G2b responses after oral administration of viable *Lactobacillus casei* YIT9029 in wistar and brown Norway rats. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 8:762-767.

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.

FAO (2012), www.fao.org

FAO/WHO, 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Available from: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf

Fernandez, F., Hinton, M., and Van Gils, B. (2002) Dietary mannanoligosaccharides and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella enteritidis* colonization. *Avian Pathology* 31(1), 49-58

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.

Firon, N; Ashkenazi, S; Mirelman, D; Ofek, I; Sharon N. Aromatic alpha-glycosides of mannose are powerful inhibitors of the adherence of type 1 fimbriated *Escherichia coli* to yeast and intestinal epithelial cells. *Infection and immunity* 55 (2): 472–6. PMC 260353. (1987).

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.

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

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.

Foubert C, Boisot P, Duperray J and Guyonvarch A 2007. Intere[^]t d'un acce[^]s limite[^] a` la mangeoire de 6h, 8h et 10 h par jour pour engendrer un rationnement alimentaire chez le lapin en engraissement. *Proceedings of the 12e[^]mes Journe[^]es de la recherche Cunicole, Le Mans, France, pp. 123–126.*

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

Garofalo, Corinne; Wellens, Adinda; Nguyen, Hien; Van Gerven, Nani; Slattegard, Rikard; Hernalsteens, Jean-Pierre; Wyns, Lode; Oscarson, Stefan . Zhang, Shuguang. ed. Intervening with Urinary Tract Infections Using Anti-Adhesives Based on the Crystal Structure of the FimH–Oligomannose-3 Complex. *PLoS ONE* 3 (4): e2040. doi:10.1371/journal.pone.0002040. (2008)

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, Murr S, Travel A, Corrent E, Foubert C, Bebin K, Mevel L, Rebours G and Renouf B 2009b. Effets du niveau de rationnement et du mode de distribution de l'aliment sur les performances et les troubles digestifs post- sevrage du lapereau. Premiers re´sultats d'une e´tude concertee du re´seau GEC. *Cuniculture Magazine* 36, 65–72.

Gidenne T, Bannelier C, Combes S and Fortun-Lamothe L 2009c. Interaction between the energetic feed concentration and the restriction strategy – impact on feeding behaviour, growth and health of the rabbit. 13e`me Journe´es de Recherches Cunicoles, Le Mans, France, pp. 63–66.

Gidenne T, Garcia J, Lebas F and Licois D 2010. Nutrition and feeding strategy: interactions with pathology. In *Nutrition of the rabbit* (ed. C De Blas and J Wiseman), pp. 179–199. CABI, UK.

Gòmez-Conde, M.S., Pèrez De Rozas, A., Badiola, I., pères-Alba, L., de Blas, J.C., Carabano, R. and Garcìa, J. (2009) .Effect of neutral detergent soluble fiber on digestion, intestinal microbiota and performance in twenty five day old weaned rabbits. *Livestock Science* 125, 192-198.

Griffiths, M. and Davies, D.(1963). The role of the soft pellets in the production of lactic acid in rabbit stomach. *Jurnal of Nutrition* 80,171-180

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.

Guedes, C.M., Mourao, J.L., Silva, S.R., Gomes, M.J., Rodrigues, M.A.M., Pinheiro, V., 2009. Effect of age and mannan-oligosaccharides supplementation on production and volatile fatty acids in the caecum of rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150:330-336.

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.

Hooge, Danny M. (2004a). Meta-analysis of Broiler Chicken Pen Trials Evaluating Dietary Mannan Oligosaccharide, 1993-2003. *International Journal of Poultry Science* 3: 163–74. doi:10.3923/ijps.2004.163.174.

Hooge, Danny M. Turkey Pen Trials with Dietary Mannan Oligosaccharide: Meta-analysis, 1993-2003. 3. pp. 179–88. **(2004b)**

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).

Huybens N., Houeix J., Licois D., Mainil J., Marlier D. Inoculation and bacterial analyses of fractions obtained From the reference inoculum tec4 Which experimentally reproduces epizootic rabbit enteropathy. *World Rabbit Sci.* 2009, 17: 185 - 193

Je´rome N, Mousset JL, Messenger B, Deglaire I and Marie P 1998. Influence de diffe´rentes me´thodes de rationnement sur les performances de croissance et d’abattage du lapin. In *A7e`mes Journe´es de Recherches Cunicoles* (ed. JM Perez), pp. 175–178. ITAVI Publishing, Paris, Lyon.

Kath, Franziskus; Kulicke, Werner-Michael. Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* 268: 59–68. (1999)

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

Knight K.L., Crane, M.A., 1994. Generating the antibody repertoire in rabbit. *Adv. Immunol.* 56: 179-218.

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.

Krizkova, L; Zitnanova, I; Mislovicova, D; Masarova, J; Sasinkova, V; Durackova, Z; Krajcovic, J. Antioxidant and antimutagenic activity of mannan neoglycoconjugates: Mannan–human serum albumine and mannan–penicillin G acylase. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 606: 72–9. (2006)

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.

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., Thèbault R.G.,(1997). In: *the rabbit-Husbandry, Health and Production* (2d edition) FAO publ., Rome, 223 pp.

Lebas F and Delaveau A 1975. Influence de la restriction du temps d'accès à la boisson sur la consommation alimentaire et la croissance du lapin. *Annales de Zootechnie* 24, 311–313.

Lebas F 1979. Efficacité de la digestion chez la lapine adulte. Effet du niveau d'alimentation et du stade de gestation. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique* 19, 969–973.

Lebas F 2007. L'utilisation de la restriction alimentaire dans le filière cunicole. *Cuniculture Magazine*, ASFC. Retrieved January 30, 2012, from <http://www.asfc-lapin.com/Docs/Activite/T-ronde-2007/T-ronde2007-1.htm>

Lebas F and Laplace JP 1982. Mensurations viscérales chez le lapin. 4. Effets de divers modes de restriction alimentaire sur la croissance corporelle et viscérale. *Annales de Zootechnie* 31, 391–430.

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>

Lesage, G.; Bussey, H.. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70 (2): 317–43. doi:10.1128/MMBR.00038-05. (2006)

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

Linquist, B.L., Leenthal, 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.

Luick B.R., El-Sayaad A.E., Cheeke P.R., (1992). Effect of fructo-oligosaccharides and yeast 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.

Marlier D, Dewree R, Delleur V, Licois D, Lassence C, Poulipoulis A and Vindevogel H 2003. A review of the major causes of digestive disorders in the European rabbit. *Annales de Medecine Veterinaire* 147, 385–392.

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 enteroxigenic *Escherichia coli* in newly-weaned pigs. *Brit.J.Nutr.*, 86, 487-498.

Merino J.M. 1994. Puesta a punto de una técnica de canulación ileal en el conejo para el estudio del aprovechamiento de los nutrientes de la dieta. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 175 pp.

Miguel, Jennifer C.; Rodriguez-Zas, Sandra L.; Pettigrew, James E. Efficacy of a mannan oligosaccharide (Bio-MosR) for improving nursery pig performance. *Journal of Swine Health and Production* 12 (6): 296–307. (2004).

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.

Mansour, Michael K.; Levitz, Stuart M.. Fungal Mannoproteins: the Sweet Path to Immunodominance. *ASM News* 69 (12): 595–600. (2003)

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. *The Veterinary Journal* 172: 493-500.

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.

J.L. Mourão a,*, V. Pinheiro a, A. Alves a, C.M. Guedes a, L. Pinto a, M.J. Saavedra a, P. Spring b, A. Kocher c Effect of mannan oligosaccharides on the performance, intestinal morphology and cecal fermentation of fattening rabbits. *Animal Feed Science and Technology* 126 (2006) 107-120

Newman, K.; Jacques, K. A.; Buede, R "Effect of mannanoligosaccharide on performance of calves fed acidified and non-acidified milk replacers". *J. Anim. Sci.* **71** (Suppl. 1): 271. . (1993).

Newsletter zootecnica n.50, del 24 maggio 2007.

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, Puelba, Mexico, 928-929.

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.

Oyetayo, V.O., Adetuyi, F.C., Akinyosoye, F.A., 2003. Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo. *Afr. J. Biotechnol.* 2:448-452.

Oyofe, BA; Deloach, JR; Corrier, DE; Norman, JO; Ziprin, RL; Mollenhauer, HH. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. *Poultry science* 68 (10): 1357–60. (1989)

Oyofe, BA; Droleskey, RE; Norman, JO; Mollenhauer, HH; Ziprin, RL; Corrier, DE; Deloach, JR (1989). Inhibition by mannose of in vitro colonization of chicken small intestine by *Salmonella typhimurium*. *Poultry science* 68 (10): 1351–6.

Oyoyo, B. A.; Deloach, J. R.; Corrier, D. E.; Norman, J. O.; Ziprin, R. L.; Mollenhauer, H. H. (1989). Effect of Carbohydrates on Salmonella typhimurium Colonization in Broiler Chickens. Avian Diseases 33 (3): 531–4. doi:10.2307/1591117.

Padilha T.S.M., Licots D., Gidenne T., Carre B., Fonty G., (1994). Evolution de la microflore -t de l'activité fermentaire caecale chez le lapereau pendant la période peri.sevrage: premier résultats. Vlèmes Journées de le 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.

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.

Perèz De Rozas, A. M., Carabano., Garcia J., Diaz J.V., Barbè J., Badiola I. (2005). Etiopatogenia de la Enteropatia Epizootica del Conejo. In proc. XXX Symposium de coní cultura, Valladolid, Spain. Pp 167-174.

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

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., Guedes, C.M., Outor-Monteiro, D., Mourao, J.L., 2009. Effect of fibre level and dietary mannanoligosaccharides on digestibility, caecal volatile fatty acids and performances of growing rabbits. Anim. Feed Sci. Technol. 148:288-300.

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.

Pinheiro V., Alves A., Mourao J.L., Guedes C.M., Pinto L., Spring P., Kocher A. Effect of Mannan oligosaccharides on the ileal morphometry and cecal fermentation of growing rabbits. 8th World Rabbit Congress september 2004.

Perrier G and Ouhayoun J 1996. Growth and carcass traits of the rabbit a comparative study of three modes of feed rationing during fattening. Proceedings of the 6th World Rabbit Congress, Toulouse, pp. 225–232.

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.

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

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.

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.

Rosen, G. D. Holo-analysis of the efficacy of Bio-MosR in broiler nutrition. British Poultry Science 48 (1): 21–6. doi:10.1080/00071660601050755. (2007a).

Rosen, G. D. "Holo-analysis of the efficacy of Bio-MosR in pig nutrition". *Animal Science* 82: 683–9. (2007).

Rosen, G. D. (2007c). Holo-analysis of the efficacy of Bio-MosR in turkey nutrition. *British Poultry Science* 48 (1): 27–32. doi:10.1080/00071660601050730.

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

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.

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

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.

Szendro Z, Szabo S and Hullar I 1988. Effect of reduction of eating time on production of growing rabbits. *Proceedings of the 4th Congress of the World Rabbit Science Association*, Budapest, Hungary, pp. 104–114.

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.

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.

Verdelhan S, Bourdillon A, Morel-Saives A and Audoin E 2004. Effect of a limited access to water on mortality of fattening rabbits. *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress*, Puebla, Mexico (ed. C Becerril and A Pro), pp. 1015–1021. Retrieved January 30, 2012, from <http://www.dcam.upv.es/1018wrc/>

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.

Vinogradov, E; Petersen, B; Bock, K. "Discussion". Carbohydrate Research 307 (1-2): 177–83. (1998)

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.

Wegener H.C. (2006). Use of antimicrobial growth promoters in food animals: the risk outweighs 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

Wismar, Rene; Brix, Susanne; Frokiaer, Hanne; Laerke, Helle Nygaard. Dietary fibers as immunoregulatory compounds in health and disease. Annals of the New York Academy of Sciences 1190: 70–85. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05256.x. (2010)

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

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 producción cunicola integrada. Proc. II Congreso Iberico de Cunicultura, Vila Real, Trás-os-Montes, Portugal, 175-184.

Yakubu A, Salako AE, Ladokun AO, AduaMMand Bature TUK 2007. Effects of feed restriction on performance, carcass yield, relative organ weights and some linear body measurements of weaner rabbits. *Pakistan Journal of Nutrition* 6, 391–396.

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.

7. SCOPO DELLA TESI

Sulla base di quanto detto nei paragrafi precedenti relativamente alle problematiche legate allo svezzamento, nonché al divieto dell'utilizzo di antibiotici come promotori della crescita, considerando poi 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, probiotici nonché dell'adozione di opportune tecniche di alimentazione 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, sui Lattobacilli (probiotici) e sulla restrizione alimentare ottenuta mediante una riduzione dell'accesso all'acqua di bevanda.

8. AZIENDA AGRICOLA MARCIANO ROSA CARMELA

La 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

EFFETTO DELL'IMPIEGO DI MANNANOLIGOSACCARIDI SULLE PERFORMANCE *IN VIVO*, SULLA DIGERIBILITA' DEI NUTRIENTI E SULLE CARATTERISTICHE DEL CONTENUTO CIECALE DI CONIGLI IN FASE DI ACCRESIMENTO

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 nonché la composizione della popolazione microbica ciecale in conigli alimentati con la stessa dieta di base, ma sottoposti a tre diversi trattamenti alimentari:

N°1) senza aggiunta di alcun additivo;

N°2) con aggiunta di antibiotici;

N°3) con aggiunta di 1g/kg di alimento di MOS.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Disegno sperimentale

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 commerciale, 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; ossitetraclina, 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 e b). L'azienda, che presenta un'anamnesi positiva per l'Enteropatie Enzootica, adotta normalmente, sotto regolare prescrizione veterinaria, un mangime addizionato con antibiotici nel periodo 35 – 60 giorni.

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

2.3. Rilievi ed analisi effettuate

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) 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 di sostanza secca (SS), 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 marcatore interno.

Le feci sono state raccolte nel corso di tre giorni consecutivi (57 – 59 giorni di età) usando reti di nylon poste sotto le gabbie utilizzate per le prove di accrescimento. Le feci fresche, separate dall'eventuale ciecotrofo presente, 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 ciecale è stato prelevato, posto in contenitori sterili ed ermeticamente chiusi, collocati 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 ciecale (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, 30m x 0.25mm x 0.25mm 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 blu, misurata alla lunghezza d'onda di 623 nm, risulta proporzionale alla concentrazione di NH₃ nel campione.

Inoltre, parte del contenuto cecale è stato utilizzato per analisi microbiologiche.

In laboratorio (dopo circa 1 ora dal prelievo) i campioni sono stati introdotti in giare per anaerobiosi e quindi 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 etereo (920.39), ceneri (942.05), proteine grezze (954.01), fibra grezza (945.18), fibra resistente al detergente acido e lignina resistente al detergente acido (973.18), fibra resistente al detergente neutro con pretrattamento amilasico (2002.04). Il contenuto di emicellulosa (14.71 %) è stato calcolato come differenza tra NDF e ADF, il contenuto di cellulosa (18.69 %) 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 etereo; 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:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

dove Y è la singola osservazione, μ la media generale, T il trattamento alimentare (i = controllo, MOS e ANT), ε 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

Nel corso della prova non si sono verificati eventi patogeni particolari. La mortalità 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 più basso ($P < 0.01$) rispetto agli altri gruppi mentre non sono emerse differenze nei pesi tra il gruppo alimentato con i MOS e quello che riceveva antibiotici. Anche l'incremento ponderale giornaliero nel gruppo controllo è risultato inferiore rispetto agli altri due gruppi ($P < 0.01$ vs. gruppo ANT e $P < 0.05$ vs. gruppo MOS) mentre non ci sono state differenze tra gruppi MOS e ANT. L'ingestione volontaria di alimento è risultata differente ($P < 0.05$) soltanto tra i gruppi ANT e controllo e quest'ultimo ha fatto registrare le ingestioni più basse. In ogni caso non sono state registrate differenze statisticamente significative tra gli indici di conversione alimentare dei tre gruppi.

Tabella 2. Rilievi in vivo

	PV 35 gg	PV 62 gg	IPG 35-62	Ingestione	ICA
	g	g	g/d	g/d	
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 ^{Aa}	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 ($P < 0.05$) digeribilità della fibra grezza rispetto al gruppo che ha ricevuto i MOS. La digeribilità della NDF non è stata influenzata dal trattamento alimentare, mentre quella dell'ADF è risultata più elevata ($P < 0.01$) nei conigli alimentati con i MOS e ciò è da attribuire ad una più elevata ($P < 0.01$) digeribilità della cellulosa rispetto agli altri due gruppi. Va rilevato, tuttavia che anche il gruppo controllo ha fatto registrare una più elevata ($P < 0.05$) digeribilità della cellulosa rispetto ai conigli che hanno ricevuto il cocktail di antibiotici. Non è stata, invece, influenzata la digeribilità delle emicellulose.

Tabella 3. Coefficienti di 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.

d SS, digeribilità della Sostanza secca; d SO, digeribilità della Sostanza Organica; dP,Gdigeribilità della Proteina Grrezza; d EE, digeribilità dell' Estratto Etereo; dFG, digeribilità della fibra grezza; dNDF, digeribilità della fibra in detergente neutro; dADF, digeribilità della fibra in detergente acido; dCELL, digeribilità della cellulosa; d Emicell,digeribilità dell'emicellulosa.

La produzione dei principali acidi grassi volatili (tabella 4) mette in evidenza un più elevata (P < 0.01) quantità di AGV e di acido acetico nel gruppo alimentato con MOS, seguito dal gruppo controllo e da quello alimentato con antibiotici. Inoltre, il gruppo alimentato con antibiotici ha fatto registrare una più bassa (P < 0.01) produzione di propinato rispetto al gruppo alimentato con i MOS, mentre non sono risultate diverse le produzioni di propionato tra i gruppi MOS e controllo. Infine, non sono emerse differenze statisticamente significative tra le produzioni di butirrato.

Tabella 4. Produzione di acido acetico, propionico, butirrico e di acidi grassi volatili totali misurati nel contenuto ciecale dei conigli in prova.

	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 branched chain proportion index (BCP) e i contenuti di ammoniaca del contenuto ciecale dei conigli dei tre gruppi in prova.

Il gruppo alimentato con MOS ha fatto registrare le produzioni significativamente più elevate di acido isobutirrico (P < 0.05) e acido isovalerianico (P < 0.01) nonché il più elevato valore di BCP (P < 0.01) rispetto agli altri due gruppi. Il gruppo alimentato con antibiotici ha presentato, inoltre, la più bassa (P < 0.05) produzione di acido isobutirrico. La produzione di acido valerianico è risultata differente (P < 0.05) soltanto tra i gruppi ANT e MOS, con valori più elevati per quest'ultimo. Infine, la produzione di ammoniaca è risultata più elevata (P < 0.01) nel gruppo controllo rispetto agli altri due gruppi.

Tabella 5 Produzione di acido isobutirrico, isovalerianico e valerianico di ammoniaca e BCP del contenuto ciecale dei conigli in prova

Produzioni di	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 ciecale dei tre gruppi in prova. Differenze significative ($P < 0.01$) sono emerse soltanto nel caso dei *Coliformi*, risultati più elevati negli animali del gruppo controllo. Nessuna differenza è emersa tra gli altri due gruppi.

Tabella 6. Conta batterica (logUFC/g) del contenuto ciecale.

	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. DISCUSSIONE

In assenza di eventi patogeni, sia gli antibiotici che i mannanoligosaccaridi non hanno alcun effetto sulla percentuale di mortalità rispetto al gruppo controllo, ma sono in grado di migliorare le performance dei conigli in produzione zootecnica nella fase di accrescimento. Inoltre, i MOS permettendo il raggiungere di risultati simili rispetto a quello ottenuto con gli antibiotici.

Tuttavia, i meccanismi d'azione con cui MOS e antibiotici sono in grado di influenzare la flora batterica intestinale sono piuttosto diversi. Infatti, il maggiore peso vivo raggiunto a fine prova dai conigli alimentati con i 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 struttura 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 ciecali, 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). Considerando il profilo degli AGV specifici per il coniglio (Gidenne *et al*, 1988.) in cui si ha una predominanza di acetato (60 - 80 mmol/100 ml), 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. Infatti, le percentuali di acetato, butirrato e propionato sono 78.0:6.7:10; 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 ciecale dei conigli alimentati con i MOS presenta anche una maggiore attività di degradazione nei confronti delle proteine rispetto agli altri due gruppi, come testimoniato dal più elevato valore di BCP. Infatti, gli acidi grassi a catena ramificata isobutirrico, isovalerianico e valerianico sono prodotti, rispettivamente, dalla degradazione degli amminoacidi valina, leucina e prolina (Van Soest, 1994); di conseguenza, una più elevata proporzione di acidi isobutirrico e isovalerianico sugli AGV totali (BCP) a parità di composizione aminoacidica delle proteine ingerite con la dieta, è indicativa di una più intensa degradazione proteica (Bovera *et al.*, 2007). Anche l'ammoniaca è un indice di degradazione delle proteine, tuttavia, mentre gli acidi grassi volatili rappresentano il prodotto finale dell'attività batterica e sono quindi un "rifiuto", l'ammoniaca viene utilizzata dagli stessi batteri in combinazione con le catene carboniose derivanti dalla fermentazione dei carboidrati, per la sintesi di nuovi amminoacidi 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 ciecale 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 registrata nel gruppo MOS, può essere spiegato 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 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 ciecali di conigli alimentati con MOS alla dose di 1 g/kg.

Deve essere osservato, tuttavia, che i valori di ammoniaca ritrovati nel contenuto ciecale dei vari gruppi di conigli rientra nel range fisiologico, se si considera che la concentrazione ciecale di ammoniaca nei conigli alimentati con diete bilanciate è compresa 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 ciecali, potrebbe indicare un maggiore turnover microbico nel contenuto ciecale 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 ciecale 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 ciecale 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 ciecale 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 garantiscono inoltre un buon sincronismo nelle fermentazioni ciecali 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 nei conigli in fase di accrescimento, in quanto apportano effetti positivi sul peso corporeo, sulla digeribilità dei nutrienti e sull'attività fermentativa della popolazione microbica ciecale

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 3

UTILIZZO DI DIETE CON L'AGGIUNTA DI MOS DURANTE IL PERIODO DI FINISSAGGIO DEL CONIGLIO: EFFETTI SULLE PERFORMANCE DI ACCRESCIMENTO, SULLA DIGERIBILITÀ DEI NUTRIENTI E SULLA QUALITÀ DELLE CARCASSE E DELLE CARNI

1. INTRODUZIONE

Il consumo di carne di coniglio dipende 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 alla qualità della carne intesa sia come salubrità (vedi scandali BSE, influenza aviaria, diossina, ecc), ma anche e soprattutto come "alimento funzionale" cioè come un prodotto che, consumato, possa avere effetti positivi sulla salute del consumatore.

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.

1.1. Qualità della carne di coniglio

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 quantità di grasso, espressa come percentuale di grasso sezionabile (3-6% della carcassa di riferimento; Dalle Zotte e Ouhayoun, 1998);
- le perdite di refrigerazione (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), sulle performance di accrescimento, sulla digeribilità dei nutrienti nonché sulla qualità delle carcasse e delle carni di conigli durante la fase di finissaggio (da 60 giorni ad età di macellazione).

3. MATERIALE E METODI

3.1. Disegno sperimentale

Per la prova sono stati utilizzati 512 coniglietti di 60 giorni di età, appartenenti al tipo genetico ibrido Hyla, del peso medio di 1718 g, omogeneamente divisi in 4 gruppi (128 conigli per gruppo) ed alloggiati tutti nello stesso capannone, in gabbie bicellulari delle 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).

I gruppi hanno ricevuto la stessa dieta di base e sono stati sottoposti ai seguenti trattamenti alimentari: 1) gruppo MOS_0.5, la cui dieta contenente era integrata con 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 contenente Bio-Mos® a 1.5 g/kg

4) gruppo CONT, dieta integrata con un antibiotico (apramicina) alla dose di 50 mg/kg. 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 e non prevede tempi di sospensione.

La dieta di base somministrata agli animali consisteva in 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 è riportata in tabella 1. Durante tutta la durata della prova, gli animali hanno avuto libero accesso sia agli alimenti che all'acqua.

Tabella 1: Composizione chimica della dieta

Sostanza secca, %	87.00
Ceneri, % s.s.	10.92
Proteine grezze, % s.s.	18.97
Lipidi grezzi, % s.s.	3.79
Fibra grezza, % s.s.	18.97
NDF, % s.s.	32.12
ADF, % s.s.	21.73
ADL, % s.s.	3.57
Cellulosa, % s.s.	18.16
Emicellulosa, % s.s.	10.93
EL, Kcal/Kg s.s	2640

3.3. Rilievi effettuati nel corso della prova

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 stati rilevati 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 marcatore 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, separate dall'eventuale ciecotrofo presente, 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 refrigerate 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, inguinale e perirenale), 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).

La carne ottenuta dallo spolpo dell'arto posteriore sinistro 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.Caratteristiche fisiche

Il pH è stato misurato nel muscolo *Biceps femoris* dopo 24 h di refrigerazione, mediante un pHmetro portatile (modello HI 9025; Hanna Strumenti, Woonsocket, RI) dotato di un elettrodo specifico per il substrato da testare (FC 230C; Hanna Instruments).

L'arto posteriore sinistro è stato asportato e utilizzato per valutare la percentuale di carne, ossa e grasso. Il rapporto carne-osso è stato calcolato secondo le indicazioni di Parigi-Bini et al. (1992) come segue:

carne / ossa = (peso del'arto posteriore - peso osso) / peso osso.

Il colore della carne è stato misurato usando un colorimetro (Minolta CR-300, illuminant D65 and 0° observer; Minolta Camera Co., Osaka, Japan, Hunter-Lab Method) ripetendo la misurazione 3 volte, dopo rotazione del campione di 90° e ripetendo la procedura in 3 differenti aree del campione. Lo strumento è stato standardizzato su una piastrella bianca, impiegando lo standard fornito con lo strumento, prima dell'esecuzione delle misurazioni ($Y = 92,8$, $x = 0,3162$, e $y = 0,3322$). Le misure colorimetriche sono state registrate 24 h dopo la macellazione, su una superficie di taglio fresca nel centro anatomico del bicipite femorale. La media aritmetica delle 9 misurazioni, effettuate sul campione di muscolo, è stata sottoposta ad analisi statistica. I parametri a^* e b^* misurati sono stati utilizzati per la determinazione di Cromo = $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ e Tinta = $\tan^{-1} (b^* / a^*)$, come indicato da Mancini et al. (2004) e Little (1975).

Il grado di tenerezza è stato testato misurato mediante il Warner- Bratzler Shear Force (WBSF) su cilindretti di bicipite femorale crudi di 1,27 cm di diametro, con taglio parallelo alla direzione delle fibre muscolari. La WBSF è stata misurata mediante Instron 1140 (Instron, High Wycombe, Regno

Unito) con una velocità di taglio trasversale di 50 mm/min e un carico di 50 N. La registrazione dello sforzo compiuto dalla lama per tagliare il campione è stata riportata su di un grafico bidimensionale carico-spostamento dando luogo al tipico tracciato tissuometrico. Da tale curva, tramite opportuni calcoli, si sono ottenuti durezza e resistenza. Le forze di taglio sono state applicate perpendicolarmente alla direzione delle fibre muscolari. Ogni campione è stato analizzato tre volte e la media aritmetica delle registrazioni ottenute da ciascun campione è stata sottoposta ad analisi statistica.

3.5. Analisi chimiche

Le analisi chimiche della dieta di base sono state effettuate utilizzando il protocollo dell' AOAC (2004): sostanza secca (Metodo 934,01), estratto etereo (metodo 920,39), ceneri (metodo 942,05), proteina grezza (Metodo 954,01), fibra grezza (metodo 945,18), ADF e ADL (Metodo 973,18), e NDF (Metodo 2.002,04). L'energia digeribile della dieta è stata calcolata secondo l'equazione proposta da Xiccato (1989): $ED = 13.68 - 0.2472 \times FG$, dove ED è l'energia digeribile apparente (MJ/kg) e FG è la fibra grezza (% tal quale). Il valore dell'ED ottenuto è stato moltiplicato per 239 per convertirlo in kcal/kg. I contenuti di cellulosa ed emicellulosa della dieta sono stati calcolati, rispettivamente, come ADF-ADL e NDF-ADF.

I campioni di carne prelevati per dissezione dall'arto posteriore sinistro sono stati analizzati utilizzando i seguenti metodi proposti dall'AOAC (1984): umidità, metodo n. 950,46; grasso, metodo n. 930,27; ceneri, metodo n. 950,153. Il contenuto proteico è stato calcolato per differenza. Il contenuto di collagene è stato determinato utilizzando il metodo riportato da Tateo et al. (2008). La determinazione del contenuto di 4-idrossiprolina è stata effettuata secondo la procedura suggerita da Kindt et al. (2003) mediante Spettrometro di massa ad elettrospray (LCQ Thermo Electron, CA, Waltham, MA).

I lipidi totali sono stati estratti mediante l'omogenizzazione di un campione di carne prelevato dall'arto posteriore sinistro con cloroformio-metanolo (2:1 v/v), secondo quanto previsto dal metodo di Folch *et al.* (1957). La determinazione della composizione degli acidi grassi della carne è stata quindi effettuata tramite gas cromatografia, previa preparazione degli esteri metilici degli acidi grassi mediante transesterificazione con metanolo in presenza di HCl 3% in metanolo (vol / vol) 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).

I risultati sono stati espressi in percentuale (peso/peso) sul totale degli Acidi Grassi degli esteri metilici. Gli indici aterogenico e trombogenico sono stati calcolati secondo Ulbricht e Southgate (1991) come segue:

indice aterogeno=

$$\frac{(C12:0 + 4 \times C14:0 + C16:0)}{[\sum MUFA + \sum(n-6) + \sum(n-3)]}$$

Indice trombogenico=

$$\frac{(C14:0 + C16:0 + C18:0)}{[0.5 \times \sum MUFA + 0.5 \times \sum(n-6) + 3 \times \sum(n-3) + \sum(n-3) \sum(n-6)]}$$

4. ANALISI STATISTICA

I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA utilizzando la procedura GLM del SAS (2000). La gabbia (1 o 2 conigli / gabbia) è stata usata come unità sperimentale. Il modello ha incluso l'effetto fisso della dieta e la gabbia è stata introdotta come effetto random. Le differenze tra le medie sono state valutate utilizzando il Tukey test e considerando significativo il livello di P inferiore a 0.05. Il tasso di mortalità è stato analizzato mediante il χ^2 test. Inoltre, le medie relative all'effetto dei trattamenti alimentari sono state confrontate mediante l'analisi dei contrasti ortogonali (Steel e Torrie, 1980).

5.RISULTATI

5.1.Performance di accrescimento

Per tutta la durata della prova, il tasso di mortalità non è risultato differente tra i gruppi in esame e si è attestato mediamente su un valore del 5.75%. Come conseguenza della mortalità, due gabbie per ogni gruppo sono state scartate e il numero di gabbie utilizzate per l'analisi statistica è risultato di 30 per gruppo.

I conigli alimentati con la dieta contenente 1.5 g/kg MOS hanno fatto registrare un più elevato incremento ponderale giornaliero (contrasto lineare e quadratico, $P < 0.01$) (Tabella 2) rispetto ai conigli alimentati con le altre diete contenenti diversi livelli di MOS; tuttavia confrontando l'incremento ponderale giornaliero (IPG) dei conigli del gruppo controllo con la media dell'IPG dei tre gruppi alimentati con l'aggiunta di MOS non sono emerse differenze statisticamente significative. Il valore medio di ingestione volontaria giornaliera di alimento, tabella 2, è diminuito ($P < 0.01$), in funzione dell'inclusione di quantità crescenti di MOS alla dieta.

Inoltre, i gruppi controllo e MOS_0.5g/kg hanno fatto registrare un'ingestione media giornaliera più elevata ($P < 0.05$) rispetto ai conigli alimentati con diete contenenti MOS in ragione di 1.0 o 1.5 g/kg di alimento. In ogni caso, l'analisi dei contrasti tra il gruppo controllo vs. tutti i gruppi alimentati con MOS, mette in evidenza una maggiore ingestione media giornaliera ($P < 0.001$) per il gruppo di controllo. L'indice di conversione alimentare (ICA) ha avuto una riduzione lineare ($P < 0.001$) in funzione del livello di inclusione di MOS nelle diete, con valori più favorevoli nel gruppo alimentato con 1.5 g/kg di MOS.

Tabella 2 Incremento ponderale giornaliero (IPG), ingestione volontaria giornaliera (IVG), e indice di conversione alimentare (ICA) registrato nei 4 gruppi trattati durante la prova(60 - 82 d)

	Trattamento				SEM ²	Analisi dei contrasti		
	Cont	MOS0.5	MOS1.0	MOS1.5		Cont vs MOS	Linear	Quadrati
IPG,g/d	33.3 ^b	33.1 ^b	32.7 ^b	34.7 ^a	0.3	NS	***	**
IVG g/d	149.9 ^a	150.4 ^a	141.9 ^b	139.6 ^b	0.8	***	***	**
ICA g/g	4.50 ^a	4.54 ^a	4.34 ^b	4.02 ^c	0.04	***	***	NS

^{a-c}a, b = $P < 0.05$. NS = non significativo, $P > 0.05$. ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

¹Control = supplementazione del gruppo di controllo (50 mg/kg di dieta) con apramicina (Elanco, Greenfield, IN; no mannanoligosaccharides, MOS;); MOS-0.5, MOS-1.0, e MOS-1.5 = gruppi supplementati rispettivamente con MOS (Alltech, Inc., Nicholasville, KY) a 0.5, 1.0 e 1.5 g/kg di dieta.

²n = 30 gabbie per gruppo (2 gabbie sono state escluse a causa della mortalità).

5.2.Digeribilità dei nutrienti

La digeribilità apparente di sostanza secca, sostanza organica, fibra grezza, NDF, ADF, cellulosa ed emicellulosa (Tabella 3) risulta incrementata dall'impegno dei MOS in confronto con il gruppo controllo ($P < 0.05$) e l'incremento mostra un andamento di tipo quadratico. La digeribilità dell'estratto etereo non ha invece subito alcun tipo di influenza in funzione del trattamento alimentare cui gli animali sono stati sottoposti.

Tabella 3 Valori della digeribilità apparente (%) dei nutrienti nei 4 gruppi trattati.

	Trattamento				SEM	Analisi dei contrasti		
	ANT	MOS_0.5	MOS_1.0	MOS_1.5		CON	Linear	Quadratic
						vs MOS		
dSS	68.82b	71.68ab	70.80ab	75.04a	1.27	*	NS	*
dSo	69.39b	72.61ab	71.74ab	75.95a	1.23	*	NS	*
dPG	81.62b	86.55ab	84.94ab	87.23a	1.00	**	NS	NS
dEE	91.64	90.92	90.91	92.79	1.01	NS	NS	NS
dFG	25.73b	35.52ab	36.34ab	45.86a	2.84	**	NS	**
dNDF	43.45b	49.57ab	47.28ab	54.28a	2.24	*	NS	**
dADF	21.22b	34.88a	32.74a	41.40a	2.36	***	NS	*
dCELL	28.31c	38.24ab	34.27bc	45.48a	2.11	**	NS	**
dEMICELL	56.76b	63.08ab	62.12ab	68.07a	2.03	**	NS	*

^{a,b,c}Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$). NS = non significativo, $P > 0.05$. * $P \leq 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

d SS= digeribilità della Sostanza secca; d SO= digeribilità della Sostanza Organica; dPG=digeribilità della Proteina Grezza; d EE= digeribilità dell' Estratto Etereo; dFG=digeribilità della fibra grezza; dNDF= digeribilità della fibra in detergente neutro; dADF= digeribilità della fibra in detergente acido; dCELL=digeribilità della cellulosa; d EMICELL=digeribilità dell'emicellulosa.

²Control = supplementazione del gruppo di controllo (50 mg/kg of diet) con apramycina (Elanco, Greenfield, IN; no mannanoligosaccharides, MOS); MOS-0.5, MOS-1.0, e MOS-1.5 = gruppi supplementari rispettivamente con MOS (Alltech, Inc., Nicholasville, KY) a 0.5, 1.0 e 1.5 g/kg di dieta.

³ $n = 30$ gabbie per gruppo (escluse 2 gabbie per mortalità).

5.3. Caratteristiche della carcassa

Il peso vivo degli animali al momento della macellazione (82 giorni di età), così come quasi tutte le caratteristiche delle carcasse, compresa la resa, non hanno fatto registrare differenze significative tra i gruppi in prova (Tabella 4). Tuttavia, i conigli alimentati con la dieta contenente 1.5g MOS/kg di dieta hanno mostrato una più elevata incidenza percentuale sul peso vivo ($P < 0.05$) dell'apparato digerente vuoto rispetto ai conigli del gruppo controllo e degli animali alimentati con 0.5 g/kg di MOS. Inoltre, i conigli alimentati con la dieta contenente 1.5 g di MOS/kg di dieta hanno fatto registrare anche una ridotto ($P < 0.05$) peso del fegato, peso espresso come percentuale della carcassa di riferimento, rispetto ai conigli alimentati con la dieta controllo.

Tabella 4 Rilievi alla macellazione e alla sezionatura

	Trattamento					Analisi dei contrasti		
	Control	MOS_0.5	MOS_1.0	MOS_1.5	SEM	Cont vs MOS	linear	quadr atico
PV, g	2376.7	2393.9	2467.6	2460.7	70.12	NS	NS	NS
CRef, g	1395.4	1393.2	1453.9	1458.3	45.72	NS	NS	NS
CR, g	1122.8	1120.4	1165.3	1182.5	39.82	NS	NS	NS
LC, cm	38.14	36.10	38.89	38.57	1.01	NS	NS	NS
CC, cm	19.00	18.50	19.22	19.29	0.67	NS	NS	NS
Pelle, % PV	15.96	15.76	15.31	15.86	0.31	NS	NS	NS
DV, % PV	8.19 ^b	8.68 ^b	8.73 ^{ab}	9.21 ^a	0.09	NS	NS	NS
RCL, %	58.77	58.07	58.94	59.26	0.30	NS	NS	NS
RCN, %	65.72	65.50	64.59	66.54	0.30	NS	NS	NS
testa, % CR	11.22	12.33	11.13	11.39	0.36	NS	NS	NS
Fegato, % CR	9.45 ^a	8.54 ^{ab}	8.43 ^{ab}	7.87 ^b	0.68	NS	NS	NS
Rene, % CR	1.25	1.45	1.39	1.42	0.08	NS	NS	NS
Cuore, % CR	2.37	2.35	2.42	2.37	0.11	NS	NS	NS
GP, % CR	1.44	1.65	1.71	1.31	0.03	NS	NS	NS
GI, % CR	0.50	0.50	0.51	0.35	0.10	NS	NS	NS
GS, % CR	1.33	0.83	0.52	1.10	0.25	NS	NS	NS

^{a,b}Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$). NS = non significativo.

¹Carcassa di riferimento = senza testa, fegato, il cuore, polmoni, esofago, trachea, timo, reni privi di grasso peri renale PV: peso vivo; DV: digerente vuoto; CRef: carcassa refrigerata; RCL:resa lorda a caldo; RCN: resa a caldo netta; CR: carcassa di riferimento; LC:lunghessa della carcassa; CC: circonferenza della carcassa; GP: grasso perirenale; GI: grasso inguinale; GS: grasso scapolare

²Control = supplementazione del gruppo di controllo (50 mg/kg of diet) con apramycina (Elanco, Greenfield, IN; no mannanoligosaccharides, MOS); MOS-0.5, MOS-1.0, and MOS-1.5 = gruppi supplementari rispettivamente con MOS (Alltech, Inc., Nicholasville, KY) at 0.5, 1.0 e 1.5 g/kg di dieta.

³n = 16 animali (8 maschi e 8 femmine) per gruppo.

5.4. Caratteristiche fisiche della carne, contenuto di collagene e solubilità

Anche per quasi tutti i parametri riportati nella Tabella 5 non sono state registrate differenze significative in funzione del trattamento alimentare dei coniglietti. Soltanto la resistenza al taglio (WBSF) del muscolo bicipite femorale è risultata diminuire con un andamento di tipo lineare (P

<0,05) con l'inclusione di livelli crescenti di MOS nella dieta, tuttavia il valore WBSF nei conigli alimentati con la dieta controllo non è risultato diverso dai valori medi misurati per i conigli alimentati con le tre diverse concentrazioni di MOS. I conigli alimentati con la dieta contenente 1.0 g di MOS/kg hanno fatto registrare una più elevata ($P < 0.05$) incidenza di ossa nell'arto posteriore sinistro rispetto ai conigli alimentati con la dieta di controllo. Di conseguenza, il rapporto carne/ossa dei conigli alimentati con la dieta contenente 1.0 g di MOS/kg è risultato inferiore ($P < 0.05$) rispetto ai conigli del gruppo controllo.

Tabella 5. Caratteristiche fisiche, contenuto di collagene e solubilità della carne dell'arto posteriore sinistro

	Trattamento					Analisi dei contrasti		
	Control	MOS_0.5	MOS_1.0	MOS_1.5	SEM	Cont vs MOS	linear	quadratico
L*	49.91	53.67	50.49	49.30	1.87	NS	NS	NS
a*	4.32	4.90	4.64	4.37	0.34	NS	NS	NS
b*	2.11	2.35	2.52	1.75	0.56	NS	NS	NS
C* (Croma)	4.86	4.99	4.85	4.55	0.78	NS	NS	NS
h* (a. di tinta)	26.15	25.67	28.54	21.75	1.97	NS	NS	NS
pH	5.84	5.84	5.76	5.82	0.03	NS	NS	NS
WBSF (Kg)	0.46 ^b	0.65 ^a	0.68 ^a	0.43 ^b	0.04	NS	*	NS
Collagene,mg/g	7.72	9.47	9.73	9.07	0.63	NS	NS	NS
Coll Sol, %	27.32	29.57	27.89	28.53	0.75	NS	NS	NS
APS, g	136.0	147.6	140.9	146.6	6.13	NS	NS	NS
Osso, % APS	17.59 ^b	18.32 ^{ab}	21.01 ^a	18.06 ^{ab}	0.84	NS	NS	NS
Carne, % APS	80.62	80.01	77.29	80.16	0.87	NS	NS	*
Grasso, %APS	1.77	1.67	1.70	1.77	0.22	NS	NS	NS
C/O	4.60 ^a	4.47 ^{ab}	3.76 ^b	4.50 ^{ab}	0.21	NS	NS	**

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

^{a,b}Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$). NS = non significativo, $P > 0.05$. * $P \leq 0.05$ and ** $P < 0.01$

²Control = supplementazione del gruppo di controllo (50 mg/kg of diet) con apramycina (Elanco, Greenfield, IN; no mannanoligosaccharides, MOS); MOS-0.5, MOS-1.0, and MOS-1.5 = gruppi supplementati rispettivamente con MOS (Alltech, Inc., Nicholasville, KY) at 0.5, 1.0 and 1.5 g/kg di dieta.

³n = 16 animali (8 maschi e 8 femmine) per gruppo.

5.5. Composizione chimica e perdite di scongelamento della carne

Non sono state osservate differenze tra i gruppi per quanto riguarda la composizione chimica della carne (Tabella 6). Tuttavia, i conigli alimentati con la dieta contenente 1.5 g/kg di MOS hanno fatto registrare perdite di scongelamento più basse ($P < 0.05$) rispetto ai conigli alimentati con la dieta di controllo. Il confronto tra il gruppo controllo e le diete MOS ha indicato, inoltre, che i conigli del

gruppo controllo hanno presentato più elevate perdite ($P < 0.01$) di scongelamento rispetto ai conigli alimentati con le diete supplementate con i MOS.

Tabella 6. Composizione chimica (g/100 g) e perdite di congelamento nella carne dell'arto posteriore sinistro

	Trattamento				SEM	Analisi dei contrasti		
	Cont	MOS_0.5	MOS_1.0	MOS_1.5		CON	Linear	Quadratic
						vs MOS		
Umidità	72.69	72.86	72.58	72.18	0.54	NS	NS	NS
Proteine	22.50	22.33	22.59	22.93	0.46	NS	NS	NS
Grassi,	3.63	3.61	3.65	3.70	0.07	NS	NS	NS
Ceneri,	1.17	1.19	1.18	1.19	0.02	NS	NS	NS
PC	2.29 ^a	1.64 ^{ab}	1.99 ^{ab}	1.21 ^b	0.17	**	NS	*

^{a,b} Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$). NS = non significativo, $P > 0.05$. * $P \leq 0.05$ and ** $P < 0.01$.

¹Control = supplementazione del gruppo di controllo (50 mg/kg of diet) con apramycina (Elanco, Greenfield, IN; no mannanoligosaccharides, MOS); MOS-0.5, MOS-1.0, and MOS-1.5 = gruppi supplementati rispettivamente con MOS (Alltech, Inc., Nicholasville, KY) at 0.5, 1.0 and 1.5 g/kg di dieta.

²n = 16 animali (8 maschi e 8 femmine) per gruppo.

5.6. Profilo acido dei grassi della carne

La concentrazione di acido palmitico (C16:0) è risultata più elevata ($P < 0.05$) nella carne dei conigli alimentati con la dieta controllo rispetto a quelli alimentati con le diete contenenti MOS a 1.0 o 1.5 g/kg. Per quanto riguarda l'acido stearico (C18:0) la sua concentrazione è stata più elevata ($P < 0.05$) nei conigli del gruppo controllo rispetto a quella dei gruppi alimentati con diete contenenti MOS; inoltre, considerando i soli conigli alimentati con MOS, la concentrazione di acido stearico ha mostrato una riduzione (di tipo lineare e quadratico, $P < 0.05$) inversamente proporzionale all'aumento dei livelli dietetici di MOS. Il totale degli acidi grassi saturi è risultato più elevato ($P < 0.01$) nella carne dei conigli alimentati con la dieta controllo rispetto alle tre diete contenenti MOS. Il contenuto di acido oleico (C18:1) è risultato maggiore ($P < 0.05$) nella carne di conigli alimentati con diete contenenti 1.0 o 1.5 g di MOS/kg rispetto alla dieta controllo e a quella contenente 0.5 g di MOS/kg. In ogni caso, la concentrazione di C18:1 nelle carni dei conigli dei tre gruppi MOS è risultata più elevata ($P < 0.05$) rispetto agli animali alimentati con la dieta controllo. La carne dei conigli alimentati con diete contenenti 1.0 o 1.5 g di MOS/kg ha fatto registrare,

inoltre, un maggior contenuto ($P < 0.05$) di acidi grassi monoinsaturi rispetto ai conigli alimentati con la dieta contenente apramicina (gruppo controllo). Analogamente, le tre diete contenenti MOS, confrontate con il gruppo di controllo hanno fatto registrare una maggiore concentrazione ($P < 0.001$) di acidi grassi monoinsaturi totali. L'indice trombogenico, invece, è risultato più elevato ($P < 0.05$) nella carne dei conigli del gruppo di controllo rispetto ai gruppi MOS.

Tabella 7. profile degli Acidi Grassi (% di esteri metilici degli acidi grassi totali) e gli indici relativi alla salute umana nella carne dell'arto posteriore di coniglio.

	Trattamento					Analisi dei contrasti		
	Contr ol	MOS_0.5	MOS_1.0	MOS_1.5	SEM	Cont vs MOS	linear	quadr atico
SFA								
Laurico 12:0	1.58	1.34	1.50	1.50	0.11	NS	NS	NS
Miristica 14:0	5.21	4.67	4.91	4.79	0.20	NS	NS	NS
Palmitico 16:0	30.78 ^a	28.11 ^{ab}	27.19 ^b	27.80 ^b	0.52	*	NS	NS
Stearico 18:0	0.87 ^a	0.78 ^b	0.67 ^c	0.67 ^c	0.03	*	*	*
Totale	38.44 ^a	34.90 ^b	34.27 ^b	34.67 ^b	0.42	**	NS	NS
MUFA								
Miristoleico 14:1	0.55	0.63	0.54	0.53	0.09	NS	NS	NS
Palmitoleico 16:1	6.39	5.91	5.47	5.84	0.23	NS	NS	NS
Oleico 18:1	27.44 ^b	29.43 ^b	31.46 ^a	30.73 ^a	0.59	*	NS	NS
Totale	34.38 ^b	35.97 ^{ab}	37.47 ^a	37.10 ^a	0.39	***	NS	NS
PUFA								
Linoleico 18:2	23.62	25.67	24.70	24.80	1.05	NS	NS	NS
γLinoleico 18:3	0.76	0.81	0.73	0.72	0.10	NS	NS	NS
αLinoleico 18:3	0.36	0.36	0.43	0.42	0.09	NS	NS	NS
Arachidonico 20:4	0.59	0.62	0.60	0.53	0.08	NS	NS	NS
C20:5ω3	0.42	0.37	0.42	0.38	0.05	NS	NS	NS
C22:5ω3	0.98	0.95	1.01	0.95	0.08	NS	NS	NS
C22:6ω3	0.45	0.35	0.37	0.43	0.04	NS	NS	NS
Totale	27.18	29.13	28.26	28.23	0.93	NS	NS	NS
Indice Aterogenico	0.86	0.74	0.74	0.74	0.04	NS	NS	NS
Indice trombogenico	1.01 ^a	0.89 ^b	0.85 ^b	0.87 ^b	0.02	*	NS	NS

^{a-c}Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$). NS = non significativo, $P > 0.05$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

¹Control = supplementazione del gruppo di controllo (50 mg/kg of diet) con apramycina (Elanco, Greenfield, IN; no mannanoligosaccharides, MOS); MOS-0.5, MOS-1.0, and MOS-1.5 = gruppi supplementati rispettivamente con MOS (Alltech, Inc., Nicholasville, KY) at 0.5, 1.0 and 1.5 g/kg di dieta.

²n = 16 animali (8 maschi e 8 femmine) per gruppo.

6. DISCUSSIONE

I risultati di questa prova hanno indicato che i MOS possono sostituire l'apramicina durante la fase di finissaggio dei conigli (60 - 82 giorni di età) senza compromettere la qualità o la composizione della carcassa, e con un miglioramento delle prestazioni produttive degli animali.

Il miglioramento dell'indice di conversione alimentare osservato nei conigli alimentati con diete contenenti MOS, piuttosto che apramicina, sembra essere da imputare ad una migliore digeribilità dei nutrienti della dieta. Mourao et al. (2006) hanno attribuito l'aumento della digeribilità dei mangimi ad un miglioramento dell'istologia intestinale, affermando che i MOS possono aumentare l'altezza dei villi e la profondità delle cripte, con un conseguente ampliamento della superficie di assorbimento intestinale. Tuttavia, nel corso della nostra prova, l'aumento della digeribilità della sostanza organica e della sostanza secca sarebbero da attribuire ad un aumento della digeribilità dei carboidrati strutturali. Questo risultato conferma in parte i risultati di nostri studi precedenti (Bovera et al. (2010a, b), in cui i conigli alimentati con una dieta contenente una quantità di MOS pari a 1.0 g/kg hanno presentato una digeribilità della cellulosa più elevata dei conigli alimentati con diete contenenti apramicina, 0.5 o 1.5 g di MOS/kg. Questo risultato può essere attribuito all'azione selettiva dei MOS sulla microflora intestinale; tale azione favorisce in modo indiretto la flora cellulolitica, responsabile delle fermentazioni dei carboidrati strutturali a scapito della flora patogena. Da ricordare che i MOS non determinano la morte dei batteri patogeni, ma ne prevengono l'attacco e la colonizzazione della mucosa intestinale, mentre gli antibiotici inibiscono la vitalità e la proliferazione non solo di alcuni agenti patogeni, ma anche della microflora saprofita dell'intestino (Ferket et al., 2002).

L'incremento della digeribilità proteica può essere attribuibile ad un miglioramento della sintesi microbica di nuovi aminoacidi partendo dall'azoto e dalle catene carboniose provenienti dalla digestione dei carboidrati. I conigli possono utilizzare questa fonte di azoto mediante la ciecotrofia. Contrariamente alle proteine, la digeribilità dei lipidi non è stata influenzata dal trattamento alimentare; infatti è riconosciuto che l'effetto principale dell'ingestione di feci molli (ciecotrofo) è quello del riutilizzo proteico (Villamide et al., 2010). I lipidi che sfuggono all'assorbimento intestinale, non sono utilizzati dalla microflora ciecale, ma solo idrogenati/deidrogenati (Fernandez et al, 1994;. Gidenne, 1996). Per questo motivo l'estratto etero contenuto nelle feci molli e in quelle dure sono abbastanza simili (Cheeke, 1987; Carabano e Piquer, 1998).

L'aumento del peso relativo del tratto gastrointestinale nei conigli alimentati con diete contenenti MOS rispetto a quelli alimentati con la dieta di controllo, è in accordo con i risultati di Piccolo et al. (2009). Questo può essere dovuto al fatto che l'inclusione di antibiotici come promotori della

crescita alle diete dei conigli causa una riduzione della massa enterica. Al contrario, l'inclusione dei MOS nelle diete non influenza la massa enterica dei conigli, ma può causare un aumento della muscolatura luminale dovuto a un aumento della motilità intestinale. Inoltre, la riduzione percentuale del fegato rispetto alla carcassa di riferimento è stata osservata anche da Piccolo et al. (2009) nel coniglio, nonché da Bonos et al. (2010) in quaglie giapponesi.

Non è facile spiegare perché una maggiore percentuale di osso e, di conseguenza, un rapporto minore carne/osso sia stato registrato nell'arto posteriore sinistro dei conigli alimentati con la dieta contenente 1.0 g di MOS/kg rispetto ai conigli alimentati con le altre diete. Analogamente, l'aumento della forza di resistenza al taglio del muscolo bicipite femorale nei conigli alimentati con 0.5 e 1.0 g di MOS/kg di alimento è difficile da spiegare. Secondo le nostre conoscenze questa ricerca è la prima che valuta gli effetti dei MOS sulla qualità della carcassa e delle carni dei conigli.

Nei conigli, gli acidi grassi endogeni (sintetizzati dai carboidrati) sono principalmente C16: 0, C18: 1 e C18: 0 (Ouhayoun et al., 1985, 1987). Gli acidi grassi polinsaturi della carne di coniglio provengono principalmente dall'ingestione esogena di lipidi (Ouhayoun, 1998), anche se la sintesi di n-3 PUFA è possibile nel fegato a partire dai precursori presenti nella dieta, e la quantità prodotta dipende dal rapporto tra n-6/n-3 della dieta (Peiretti e Meineri, 2008). Tuttavia, secondo alcuni autori (Furuse et al, 1992; Castellini et al, 2002; Dal Bosco et al, 2004), la composizione degli acidi grassi dei tessuti animali può essere modificata per effetto dell'azione della microflora gastro-intestinale, perché i microrganismi sono in grado di idrogenare gli acidi organici insaturi in poliinsaturi, o anche di desaturare alcuni acidi organici. Castellini et al. (2002) hanno sottolineato il ruolo della microflora cecale, mostrando che la reingestione delle feci molli produce una maggiore concentrazione di n-3 PUFA a catena lunga nella carne. Tuttavia, nelle specie che non effettuano la ciecotrofia, come la quaglia giapponese e il suino, Rekiel et al. (2005) e Bonos et al. (2010) hanno osservato una minore concentrazione di acido palmitico e una maggiore concentrazione di acido oleico nelle carni degli animali a cui era stato aggiunto MOS nella dieta alla concentrazione di 1.0 g/kg; entrambi gli autori hanno attribuito questo risultato a una diversa azione della microflora intestinale.

Nella nostra prova, le cause principali a cui si attribuiscono le differenze nel profilo acido dei grassi della carne, sono la diminuita concentrazione di acidi grassi saturi (AGS) (principalmente, C16:0) e l'aumentata concentrazione degli acidi grassi monoinsaturi (AGM) (principalmente C18:1), mentre nessun cambiamento si è riscontrato nella concentrazione degli acidi grassi polinsaturi (AGP) quando la concentrazione degli acidi grassi è stata espressa come percentuale del totale degli AG. La nostra ipotesi è che l'effetto dei MOS sulla microflora intestinale possa aver favorito microrganismi con capacità di sintesi di acidi grassi diverse da quelle della microflora selezionata

dagli antibiotici, e questo potrebbe aver influenzato la composizione acidica dei grassi della carne dei conigli in prova. Inoltre, la carne dei conigli del gruppo controllo ha presentato un indice trombogenico maggiore a causa della maggiore concentrazione di C16:0 e C18:0, e una minore concentrazione di acidi grassi monoinsaturi, in particolare di C18:1. Alcuni dati epidemiologici e lavori sperimentali indicano che a una dieta ricca di AGS (C12:0, C14:0 e C16:0) è associato un aumento della concentrazione del colesterolo sierico, che a sua volta è collegato ad un'umentata incidenza di malattie coronariche. Inoltre, gli acidi grassi saturi a lunga catena (C14:0, C16:0 e C18:0) accelerano la formazione di trombi, a differenza degli acidi grassi mono e polinsaturi (Ulbricht e Southgate, 1991).

7. CONCLUSIONI

Dai risultati descritti nelle pagine precedenti, emerge che l'impiego di MOS in quantità crescenti da 0 a 1.5 g/kg migliora in maniera lineare l'indice di conversione alimentare dei conigli durante la fase di finissaggio. Inoltre i MOS possono migliorare la qualità della carne modificando il profilo degli acidi grassi, con una riduzione della quota degli acidi grassi saturi , un aumento dei monoinsaturi e una riduzione dell'indice trombogenico. Pertanto, i mannanoligosaccaridi possono essere utilizzati in sostituzione all'apramicina, nelle diete di conigli durante il periodo di finissaggio, senza effetti negativi sulle caratteristiche fisiche e chimiche delle carni.

8. BIBLIOGRAFIA

AOAC. 1984. Official Methods of Analysis. 14th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, DC.

AOAC. 2004. Official Methods of Analysis. 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.

Blasco, A., and J. Ouhayoun. 1996. Harmonization of criteria and terminology in rabbit meat research. Revised proposal. *World Rabbit Sci.* 4:93–99.

Blasco A., Ouhayoun J., Masoero G. 1992. Status of rabbit meat and carcass: Criteria and terminology. *Options Méditerranéennes, Série Séminaire, n°17, 105-120.*

Bielanski, P., ZAJAC, J., FIJAL, J., 2000. Effect of genetic variation of growth rate and meat quality in rabbits. In *Proceedings of the 7th World Rabbit Congress.* Valencia, Spain, 4-7 July, 2000, p. 561-566.

Bonos, E. M., E. V. Christaki, and P. C. Florou-Paneri. 2010. Performance and carcass characteristics of Japanese quail as affected by sex or mannan oligosaccharides and calcium propionate. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 40:173–184.

Bovera, F., S. Marono, C. Di Meo, G. Piccolo, F. Iannaccone, and A. Nizza. 2010a. Effect of mannanoligosaccharides supplementation on caecal microbial activity of rabbits. *Animal* 9:1522–1527.

Bovera, F., S. Nizza, S. Marono, K. Maliardo, G. Piccolo, R. Tudisco, L. de Martino, and A. Nizza. 2010b. Effect of mannanoligosaccharides on rabbit performance, digestibility and rectal bacterial anaerobic populations during an episode of epizootic rabbit enteropathy. *World Rabbit Sci.* 18:9–16.

Carabano, R., and J. Piquer. 1998. The digestive system of the rabbit. Pages 1–16 in *The nutrition of the rabbit.*

Castellini, C., C. Mugnai and A. Dal Bosco. 2002b. Effect of organic production system on broiler carcas and meat quality. *Meat Sci.* 60:219-225

Cheeke, P. R. 1987. Rabbit feeding and nutrition. Acad. Press, Orlando, Florida.

Christie WW, Sebedio JL, Juanéda P (2001). A practical guide to the analysis of conjugatedlinoleic acid. *Inform* 12: 147-152

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

Dal Bosco, A., Castellini, C., Bernardini, M., 2000. Productive perfomance 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.

Dal Bosco, A., C. Castellini, L. Bianchi, and C. Mugnai. 2004. Effect of dietary a-linolenic acid and vitamin E on the fatty acid composition, storage stability and sensory traits of rabbit meat. *Meat Sci.* 66:407–413.

Delle Zotte A. 2004. Avantages diététiques: le lapin doit apprivoiser le consommateur. *Viandes et Produits Carnés.* 23, 161 - 167.

Delle Zotte A., Ouhyoun J., 1998. Effect of genetic origin, diet and weaning weighy on carcass composition, muscle physicochemical traits in the rabbit. *Meat Sci.*, 50(4), 471-478

EU (European Union). 2005. Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. Accessed Dec. 22, 2005. <http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference = IP/05/1687&format = HTML &aged = 0&language = EN&guiLanguage = en>.PDF

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.

Ferket, P. R., C. W. Parks, and J. L. Grimes. 2002. Benefits of dietary antibiotic and mannan oligosaccharide supplementation for poultry. Pages 22–43 in Proc. Multi-State Poult. Feeding and

Nutr. Conf., Indianapolis, IN.

Fernandez, C., A. Cobos, and M. J. Fraga. 1994. The effect of fat inclusion on diet digestibility in growing rabbits. *J. Anim. Sci.* 72:1508–1515.

Folch, J., M. Lees, and H. Sloane-Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497–502.

Fonseca, A. P., L. Falcao, A. Kocher, and P. Spring. 2004. Effect of dietary mannan oligosaccharide in comparison to oxitetracyclin on performance of growing rabbits. Pages 829–833 in *Proc. 8th World Rabbit Congr., Puebla, Mexico*. C. Becerril, and A. Pro, ed. Puebla, Mexico.

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

Gidenne, T. 1996. Nutritional and ontogenic factors affecting rabbit caeco-colic digestive physiology. Pages 13–28 in *Proc. 6th World Rabbit Congr., Toulouse, France*. F. Lebas, ed. Association Francaise de Cuniculture, Lempdes, France.

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

Kindt, E., K. Gueneva-Boucheva, J. Rekhter, M. D. Humphries, and H. Hallak. 2003. Determination of hydroxyproline in plasma and tissue using electrospray mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33:1081–1092.

Little, A. C. 1975. Off on a tangent. *J. Food Sci.* 40:410–411.

Mancini, R. A., M. C. Hunt, K. A. Hachmeister, D. H. Kropf, and D. E. Johnson. 2004. Ascorbic acid minimizes lumbar vertebrae discoloration. *Meat Sci.* 68:339–345.

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., V. Pinheiro, A. Alves, C.M. Guedes, L. Pinto, M. J. Saavedra, P. Spring, and A. Kocher. 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. 1998. Influence of the diet on rabbit meat quality. Pages 177–195 in *The nutrition of the rabbit*. C. De Blas, and J. Wiseman, ed. CAB International, Wallingford, UK.

Ouhayoun, J., D. Delmas, G. Monin, and P. Roubiscoul. 1990. Abbatage du lapin. II. Effect du mode de refrigeration sur la biochimie et la contraction des muscles. Page 45 in *Proc. 5èmes Journées de la Recherche Cunicoles*, Paris. ITAVI, ed. Paris, France.

Ouhayoun, J., T. Gidenne, and Y. Demarne. 1985. Evolution postnatale de la composition en acides gras des lipids du tissue musculaire chez le lapin en regime hypolipidique. *Reprod. Nutr. Dev.* 25:505–509.

Ouhayoun, J., J. Kopp, M. Bonnet, Y. Demarne, and D. Delmas. 1987. Influence de la composition des graisses alimentaires sur les proprietes des lipides perirenaux et la qualité de la viande de lapin. *Sci. Alim.* 7:521–527.

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.

Peiretti, P. G., and G. Meineri. 2008. Effects on growth performance, carcass characteristics, and the fat and meat fatty acid profile of rabbits fed diets with chia (*Salvia hispanica* L.) seed supplements. *Meat Sci.* 80:1116–1121.

Piccolo, G., F. Bovera, C. Di Meo, N. Vella, M. I. Cutrignelli, and A. Nizza. 2009. Mannan oligosaccharides as growth promoter in finishing rabbit: Effect on in vivo performance and carcass traits. *Ital. J. Anim. Sci.* 8:796–798.

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.

Rehman, H., W. Vahjen, A. Kohl-Parisini, A. Ijaz, and J. Zentek. 2009. Influence of fermentable carbohydrates on the intestinal bacteria and enteropathogens in broilers. *Worlds Poult. Sci. J.* 65:75–89.

Rekiel, A., J. Wiecek, and M. Dziuba. 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.* 50:561–567.

Roe, M. T., and S. D. Pillai. 2003. Monitoring and identifying antibiotic resistance in bacteria. *Poult. Sci.* 82:622–626.

Spais, A. B., P. Florou-Paneri, and E. Christaki. 2001. The bases of mammal and bird nutrition. *Ekdoseis Sighroni Paideia, Thessaloniki, Greece.*

Spring, P., C. Wenk, K. A. Dawson, and K. E. Newman. 2000. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentration of enteric bacteria in the ceca of Salmonella-challenged broiler chicks. *Poult. Sci.* 79:205–211.

SAS/STAT Users Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. **Steel, R. G. D., and J. H. Torrie.** 1980. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach.* 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York.

Tateo, A., P. De Palo, E. Ceci, and P. Centoducati. 2008. Physicochemical properties of meat of Italian Heavy Draft horses slaughtered at the age of eleven months. *J. Anim. Sci.* 86:1205– 1214.

Ulbricht, T. L., and D. A. T. Southgate. 1991. Coronary heart disease: Seven dietary factors. *Lancet* 338:985–992.

Villamide, M. J., N. Nicodemus, M. J. Fraga, and M. Carabano. 2010. Protein digestion. Pages 39–55 in *Nutrition of the rabbit*. C. De Blas, and J. Wiseman, ed. CAB International, Wallingford, UK.

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

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 DELL'APPLICAZIONE MEDIANTE SPRAIZZAZIONE DI *LACTOBACILLUS PLANTARUM*, SULLE PERFORMANCE DI ACCRESCIMENTO, SULLE FERMENTAZIONI CIECALI E SU ALCUNI PARAMETRI EMATOLOGICI DI CONIGLIETTI DURANTE LA FASE DI ALLATTAMENTO

1. INTRODUZIONE

I lattobacilli non sono microrganismi normalmente costituenti la flora batterica dell'apparato digerente del coniglio in quanto, secondo alcuni autori (Maertens et al., 2006), aderiscono poco alle cellule epiteliali dell'intestino: per questo motivo il loro impiego in conigliocoltura suscita alcune perplessità (Yu e Zeni, 1993). Tuttavia, studi clinici nei conigli da compagnia (Fann et al., 2001) hanno dimostrato che i lattobacilli possono essere utilizzati con successo in caso di enteriti, in associazione alle terapie antibiotiche, migliorando i tempi di guarigione degli animali. I meccanismi d'azione che gli autori hanno ipotizzato sono due: il primo sarebbe legato al fatto che i lattobacilli sembrano avere un effetto inibitorio nei confronti dei ceppi patogeni di *E. coli* (Abo-El- Khair et al., 1993) e quindi potrebbe essere utile somministrarli in caso di sovrappopolazione di *E. coli*; la seconda ipotesi è che, anche nel coniglio, i lattobacilli possano essere normali abitanti dell'intestino (Das et al., 1997) ma che la somministrazione inappropriata di antibiotici ne determini una progressiva e drastica riduzione, fino alla totale scomparsa. D'altra parte, l'aggiunta alla dieta di batteri vivi (probiotici) può creare qualche difficoltà nel coniglio svezzato poiché il pH dello stomaco molto basso rappresenta un'efficace barriera. Nei coniglietti lattanti, invece, il pH dello stomaco è ancora abbastanza elevato, agevolando il passaggio dei batteri nell'intestino. Ovviamente, nelle condizioni di allevamento, non avendo la fattrice una popolazione batterica che comprende lattobacilli, essi non passeranno nel canale digerente dei giovani animali. Proprio per questi motivi, la somministrazione dei lattobacilli dovrebbe essere effettuata quanto prima possibile nella vita dell'animale (Schneitz et al., 1992). Inoltre, le modalità di somministrazione devono essere efficaci. Poiché la via più comune di somministrazione consiste nell'inclusione dei probiotici nell'acqua di bevanda, bisognerebbe fare in modo che gli animali assumano in tempi brevi l'acqua con aggiunta di probiotico, per evitare perdite della funzionalità o del numero dei batteri utilizzati. Questi problemi possono essere ridotti al minimo se il probiotico è somministrato mediante l'applicazione di spray, come osservato da Wolfenden et al. (2007) nel pollame. Secondo l'autore, l'applicazione spray offre diversi vantaggi rispetto a quella in acqua potabile o individuale con sonda gastrica.

2. OBIETTIVO DELLA RICERCA

Lo scopo della nostra ricerca è stato quello di somministrare mediante tecnica spray il *Lactobacillus Plantarum* a coniglietti lattanti allo scopo di verificare un eventuale insediamento del batterio nell'apparato digerente, nonché di valutare gli effetti sulle performance di accrescimento, sull'andamento delle fermentazioni ciecali e su alcuni parametri ematologici.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Disegno sperimentale

La prova è stata condotta in un'azienda commerciale di conigli da carne situata in San Giorgio La Molara (BN, Italia).

Due giorni prima del parto, 228 coniglie di razza Bianca di Nuova Zelanda (peso medio 4.25 ± 0.36 kg, media numero di parti medio 3 ± 0.5) sono state omogeneamente suddivise in due gruppi (114 fattrici per gruppo) e alimentate con la stessa dieta. Le coniglie sono state sistemate in apposite gabbie (50×70 cm e 35 cm di altezza) dotate di nidi. Il capannone ospitante le fattrici, dotato di impianto di riscaldamento e ventilazione forzata, ha permesso di mantenere la temperatura a 21 ± 3 °C per tutta la durata della prova. Il programma luminoso adottato ha previsto la somministrazione di 16 ore di luce e 8 ore di buio. Fino al ventesimo giorno di lattazione le fattrici hanno ricevuto, *ad libitum*, una dieta commerciale per fattrici in riproduzione priva di antibiotici (PG 17.7 %, amido 15.5 %, ADF 19.1 %). A 11 giorni dal parto le coniglie sono state inseminate nuovamente, e la gravidanza è stata rilevata mediante palpazione addominale due settimane dopo l'inseminazione. Al momento del parto, le nidiate sono state pareggiate a 8 coniglietti per fattrice. Da questo momento sono stati applicati diversi trattamenti ai coniglietti dei due gruppi: il gruppo di controllo (CONT) non ha ricevuto alcun tipo di supplementazione; nel gruppo sperimentale (LAC), i coniglietti all'interno dei nidi hanno ricevuto, tramite applicazione spray, un prodotto commerciale (MIX-AVI® pro, IVS-Wynco LLC, Springdale, AR, USA) contenente *Lactobacillus plantarum* liofilizzato (Tabella 1). Secondo le istruzioni del produttore, *L. plantarum* è stato disciolto in acqua ad una concentrazione attesa di 5×10^6 CFU/ml. Una volta completata la solubilizzazione della polvere in acqua, la miscela è stata spruzzata sulle nidiate e sull'nido stesso (~ 4 mL per nido, 0.5 mL per coniglio, che corrisponde a 2.5×10^6 CFU di *L. plantarum* per animale) utilizzando uno spruzzatore manuale da giardinaggio. Il trattamento con *L. plantarum* è stato effettuato una volta al giorno per

sette giorni consecutivi immediatamente dopo il parto, e dopo una settimana di riposo, è stato ripetuto per un'altra settimana secondo le stesse modalità prima descritte.

Tabella 1. Composizione microbiologica del prodotto a base di *Lactobacillus plantarum* utilizzato nella prova.

<i>Lactobacillus plantarum</i>	10 x 10 ⁹ CFU/g
<i>Enterobacteria</i>	100 CFU/g
Batteri sporigeni	200 CFU/g
Lieviti	< 10 CFU/g
<i>Escherichia coli</i>	Assente
<i>Salmonella</i> spp.	Assente
<i>Stafilococcus aureus</i>	Assente

3.2. Performance di accrescimento in vivo

Il tasso di mortalità è stato registrato quotidianamente su tutte le nidiate (114 nidi, 912 coniglietti per gruppo). Le performance di accrescimento sono state registrate su 24 nidi (192 coniglietti) scelti a caso in ogni gruppo. Fino a 21 giorni di età, i nidi sono stati aperti la mattina (~ 08:30) per consentire l'ingresso della fattrice e chiusi subito dopo l'allattamento. Pertanto, il consumo di latte delle nidiate è stato misurato pesando la fattrice prima e dopo l'allattamento. A 21 giorni dal parto il mangime della fattrice è stato sostituito con un mangime per svezzamento (Tabella 2), anch'esso privo di antibiotici. Sempre da questa età dei coniglietti, i nidi sono rimasti aperti tutto il giorno in modo da consentire l'inizio dello svezzamento. A partire dal 21° giorno di età dei coniglietti, non è stato più possibile misurare la produzione di latte delle fattrici né controllare la quantità di alimento ingerita dei coniglietti per problemi di gestione aziendale. Dalla nascita al 35° giorno di età (età svezzamento), il peso delle nidiate è stato misurato settimanalmente per calcolare l'incremento giornaliero di peso vivo.

Tabella 2 Composizione chimica della dieta utilizzata dalla fattrice e dai coniglietti a partire dal 21° al 35° giorno di età

SS	Ceneri	PG	EE	FG	NDF	ADF	ADL
%	% SS						
89.7	8.09	14.9	2.74	20.2	38.9	26.3	7,46

Ingredienti: erba medica, orzo, crusca di frumento, cruschetto, farina di girasole, polpa di barbabietola, carbonato di calcio, cloruro di sodio. Supplementazione per Kg di dieta: vitamina A, 8375 U; vitamina D3, 750 U; vitamina E, 20 mg; vitamina K3, 1 mg; vitamina B1, 1 mg; vitamina B2, 2 mg; vitamina B6, 1 mg; acido nicotinico, 20 mg, cloruro di colina, 250 mg; magnesio, 290 mg; manganese, 20 mg; zinco, 60 mg; iodio, 1.25 mg; ferro, 26 mg; rame, 10 mg; cobalto, 0.7 mg.

3.3. Analisi chimica delle diete

Le diete utilizzate sono state analizzate mediante le seguenti procedure indicate dall'AOAC (2004): sostanza secca, metodo n. 934,01; estratto etereo, ceneri, proteine grezze, metodo n. 945,18; ADF e ADL, metodo n. 973,18; NDF, metodo n. 2.002,04.

3.4. Analisi microbiologica

Allo svezzamento (35 giorni di età), 12 conigli per gruppo sono stati macellati in un macello specializzato dopo 12 ore di digiuno. Il cieco è stato legato ad entrambe le estremità, separato impiegando strumenti sterili dal resto del tratto gastrointestinale, posto in sacchetti di plastica ben chiusi e sistemato in un termos preriscaldato. Dopo il campionamento, il materiale è stato trasportato quanto prima (ca. 1 h) presso i laboratori del nostro Dipartimento. Giunti in laboratorio, i campioni di contenuto ciecale sono stati asetticamente prelevati e immediatamente diluiti in acqua distillata, utilizzando le seguenti diluizioni seriali: 0, -4, -7, -9. Da ogni diluizione, 0,1 mL sono stati strisciati su piastre di agar selettive per la crescita di lattobacilli (BD Diagnostic Systems, Heidelberg, Germania) e incubate in condizioni di microaerobiosi per 48 h alla temperatura di 37 °C. Le colonie di lattobacilli sono state identificate con sistema API 50 CH (bioMérieux, Inc., Marcy l'Etoile, France).

3.5. Fermentazioni ciecali

Aliquote di contenuto ciecale (ca. 5 mL) sono state utilizzate per la determinazione degli acidi grassi volatili (AGV). Dopo diluizione dei campioni con acido ossalico 0.03 M (1:4, v/v), gli AGV

sono stati determinati mediante gascromatografia utilizzando uno strumento (mod. GC 8000top, CE Instruments Rodano, Milano, Italia) dotato di colonna capillare (NUKOLTM fused silica, 30m x 0.25mm x 0.25mm film thickness, Supelco analitica, Bellefonte, PA, USA) e impostando i seguenti parametri analitici: temperatura d'analisi 135° C, detector a fiamma ionica 180° C, gas carrier elio a flusso costante di 10 mL/min, pressione 133 kPa. Il tempo di eluizione degli standard variava da 3.9 e 8.4 min, ed il tempo totale della corsa è stato 14 min.

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.

3.6. Parametri ematologici

Prima della macellazione, subito dopo lo stordimento, sono stati raccolti dei campioni di sangue da ciascun coniglio tramite puntura cardiaca. Il sangue è stato raccolto in due diverse provette, una delle quali contenente K3EDTA.

Il siero è stato ottenuto per centrifugazione a 2000 giri per 15 minuti ed è stato utilizzato per la determinazione dell'aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT) e colesterolo.

Tutti i campioni sono stati analizzati mediante spettrofotometro (BIOMATE6, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) utilizzando appositi kit commerciali (Spinreact, Sant Esteve de Bas, Spagna), le siero proteine sono state misurate utilizzando il sistema elettroforetico SELVET24 (Seleo Ingegneria S.r.l., Melito, NA, Italia). I campioni contenenti K3EDTA sono stati utilizzati per la determinazione dell'emocromo mediante il sistema di ematologia 120 ADVIA (Siemens, Monaco di Baviera, Germania).

4. ANALISI STATISTICA

I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA utilizzando la procedura GLM (General Linear Model, SAS Inst. Inc., Cary, NC 2000) per verificare l'effetto del trattamento con *L. plantarum*. Il tasso di mortalità è stato analizzato utilizzando il χ^2 -test.

5.RISULTATI

La Tabella 3 mostra il tasso di mortalità registrato durante la prova. Considerando l'intero periodo sperimentale il gruppo LAC ha presentato una più bassa ($P < 0.05$) mortalità rispetto al gruppo CONT.

Tabella 3 Tasso di mortalità settimanale e dell' intero periodo (espresso in percentuale e come numero di conigli morti sul totale)

Settimane	LAC N=912	CONT N=912	P
1-7g	1(9/912)	3.1(28/912)	0.15
8-14g	1.5(14/903)	3.2(28/884)	0.29
15-21g	2(18/890)	5.0(43/856)	0.14
22-28g	4.4(38/872)	4.7(38/813)	0.80
29-35g	1(9/834)	1.3(10/775)	0.96
1-35g	9.6(88/912)	16.2(147/912)	0.04

LAC, gruppo trattato con *Lactobacillus plantarum*; CONT, gruppo di controllo.

Nessuna differenza significativa è stata registrata tra i gruppi per l'assunzione media giornaliera di latte da 1 a 21 giorni di età né per il peso vivo medio delle nidiatae da 1 a 35 giorni di età (Tabella 4). La produzione degli acidi grassi volatili totali (Tabella 5) è risultata del 71%, più elevata nel gruppo LAC rispetto al gruppo CONT ($P < 0.01$), ma la percentuale dei principali AGV sul totale non è stata modificata dal trattamento adottato. Il rapporto tra C3 a C4 è risultato del 35% inferiore ($P < 0.05$) nei conigli del gruppo LAC rispetto al controllo. Non vi è stata differenza significativa per il valore del BCP tra i gruppi.

Tabella 4 Performance in vivo dei conigli in lattazione

Settimane	LAC	CONT	RMSE	P
	N=912	N=912		
1-7g	132	132	27.2	0.92
8-14g	202	195	38.4	0.55
15-21g	229	242	36.2	0.22
Media del peso corporeo				
1g	82.6	81.0	10.0	0.60
7g	182	181	21.0	0.89
14g	285	290	34.6	0.59
21g	423	441	57.4	0.29
28g	698	755	111	0.09
35g	938	932	116	0.34
Media dell' increment di peso g/gg				
1-7g	14.2	14.3	2.10	0.87
8-14g	14.7	15.6	2.61	0.24
15-21g	19.7	21.7	4.49	0.15
22-28g	37.9	41.8	11.4	0.05
29-35g	34.3	24.9	9.85	0.04
1-35g	24.2	23.7	5.11	0.68

LAC, gruppo trattato con *lactobacillus plantarum*; CONT, gruppo di controllo; RMSE, errore quadratico medio

Tabella 5 Produzione di Acidi Grassi Volatili(espresso in % molare sulla produzione totale di Acidi Grassi Volatili) nel contenuto ciecale dei conigli in prova

	LAC	CONT	RMSE	P
	N=8	N=8		
Acetato	73.0	73.1	2.11	0.42
Propionato	7.10	9.03	0.92	0.138
Butirrato	18.1	15.0	0.95	0.10
Isobutirrato	0.56	0.70	0.024	0.052
Isovalerianico	0.65	0.55	0.0364	0.205
Valerianico	0.81	1.59	0.143	0.659
C3:C4	0.39	0.60	0.039	0.0105
Total AGV, mmol/L	24.8	14.5	2.09	0.0002
BCP	0.012	0.012	0.0007	0.199

LAC= gruppo trattato con *Lactobacillus plantarum* ; CONT= gruppo di controllo; RMSE=errore quadratico medio; AGV=Acidi Grassi Volatili; BCP, branched chain proportion [(isobutirrico, mmol/L + isovalerianico, mmol/L)/AGV Totali].

In Tabella 6 sono riportati i valori corrispondenti alla conta dei globuli bianchi totali e delle loro diverse frazioni. Nessuna differenza è stata riscontrata nel conteggio dei globuli bianchi totali, tuttavia alcune differenze hanno riguardato le diverse frazioni di leucociti. In particolare, il gruppo LAC ha presentato una più alta percentuale di linfociti ($P < 0.05$), e minori contenuti di neutrofili ($P < 0.05$) ed eosinofili ($P < 0.01$).

Tabella 6 Globuli bianchi totali e profilo dei globuli bianchi nei conigli dei gruppi in prova

	LAC	CONT	RMSE	P
	N=8	N=8		
GB, $10^3 \times \mu\text{L}$	7.96	8.48	0.92	0.4064
Neutrofili, %	19.13	25.95	3.26	0.0118
Linfociti, %	73.64	63.88	5.33	0.0211
Monociti, %	2.31	2.19	0.69	0.8011
Eosinofili, %	1.15	2.35	0.37	0.0024
Basofili, %	2.36	2.32	0.37	0.8769

GB= globuli bianchi; LAC= gruppo trattato con *Lactobacillus plantarum* ; CONT= controllo; RMSE= scarto quadratico medio

Nessuna differenza è stata osservata tra i gruppi per i monociti e basofili. I conigli del gruppo CONT hanno fatto registrare livelli più elevati ($P < 0.01$) di globuli rossi, emoglobina ed ematocrito (Tabella 7), rispetto ai conigli del gruppo LAC. Non sono state osservate altre differenze significative per i altri parametri riportati in tabella. La variabilità individuale della conta piastrinica, probabilmente, non ha permesso di raggiungere la significatività statistica; tuttavia, è interessante notare che il gruppo CONT ha avuto una conta piastrinica media quasi doppia rispetto al gruppo LAC. Infine, il colesterolo è risultato più elevato ($P < 0.01$) nel gruppo CONT.

Colonie di *L. plantarum* appartenenti allo stesso ceppo presente nel prodotto commerciale utilizzato, sono state isolate esclusivamente nel contenuto ciecale dei conigli del gruppo LAC con un tenore medio di 1.25×10^6 UFC/g.

Tabella 7 valori dei parametri ematologici nei due gruppi di conigli

	LAC	CONT	RMSE	P
	N=8	N=8		
GR, $10^6 \times \mu\text{L}$	4.34	4.86	0.25	0.006
Emoglobina, g/dL	9.60	10.84	0.52	0.0021
Ematocrito, %	35.36	40.77	2.76	0.0073
MCV, fL	81.40	83.92	4.61	0.3706
MCH, pg	22.12	22.33	0.60	0.5681
MCHC, g/dL	27.40	26.63	1.17	0.3931
RDW, %	17.68	16.17	2.43	0.3133
HDW, g/dL	2.09	1.91	0.21	0.1840
Piastrine, 10^3 x mL	172	321	239.23	0.3120
MPV, fL	20.84	20.04	4.81	0.7832
PCT, %	0.39	0.75	0.76	0.4333
PDW, %	62.70	62.51	6.56	0.9624
AST, U/L	66.80	61.57	29.36	0.7672
ALT, U/L	42.40	44.14	12.76	0.8205
Colesterolo, mg/dL	53.68	83.43	10.34	<0.001

LAC= gruppo trattato con *Lactobacillus plantarum*; CONT= gruppo di controllo; RMSE, scarto quadratico medio; GR, globuli rossi; MCV, volume corpuscolare medio; MCH, contenuto medio di emoglobina per ciascun globulo rosso; MCHC, concentrazione media dell' emoglobina corpuscolare; RDW, indice di distribuzione del volume eritrocitario; HDV, indice di distribuzione dell' emoglobina; MPV, Volume piastrinico medio; PCT, piastrinocrito; PDW, platelet distribution width; AST, aspartato aminotransferasi; ALT, alanine aminotransferasi.

6. DISCUSSIONE

L'uso di *Lactobacillus plantarum* nei coniglietti dalla nascita fino allo svezzamento (35 giorni di età) sembra fornire risultati interessanti. Le performance di accrescimento degli animali non sono state influenzate dal trattamento, e di conseguenza, il peso allo svezzamento è risultato simile in entrambi i gruppi.

Nonostante ciò, le caratteristiche microbiologiche dell'apparato digestivo e lo stato immunitario dei coniglietti che hanno ricevuto il trattamento spray con *L. plantarum* sembrano essere più idonee per affrontare il periodo post-svezzamento in cui i tassi di mortalità sono spesso elevati. Nella nostra prova, il contenuto ciecale dei coniglietti trattati con lattobacilli presenta delle caratteristiche di fermentazione diverse rispetto all'altro gruppo. Infatti, la maggiore produzione di AGV totali, nel gruppo LAC, suggerisce una più intensa attività fermentativa della popolazione microbica ciecale, anche se non si è riscontrata nessuna differenza nella proporzione molare tra acetato, propionato e butirato tra i gruppi. Il rapporto tra C3 a C4 per entrambi i gruppi è risultato essere compreso nel range fisiologico proprio dei conigli allo svezzamento, pur essendo significativamente più basso nel gruppo LAC, indicando la prevalenza del butirato in questi animali.

E' noto (Van Soest, 1993) che la produzione di acido acetico deriva dalla fermentazione dei carboidrati strutturali ad opera dei batteri cellulolitici, mentre la produzione di propionato e butirato dalla fermentazione dei carboidrati non strutturali. Il butirato sembra essere una fonte preferenziale di energia per le cellule del grosso intestino (Carabano et al., 1998), e la maggiore quantità prodotta (4.49 mmol/l vs. 2.18 mmol/l) nel contenuto ciecale dei conigli del gruppo LAC, potrebbe suggerire un più favorevole stato sanitario delle cellule intestinali dovuto ad un più intenso turnover.

Considerando il profilo specifico degli AGV del coniglio (Gidenne et al., 1988), dove c'è una predominanza di acetato (60-80% del totale AGV), seguita dal butirato (8-20%) e poi dal propionato (3-10%), i nostri risultati rientrano nel normale intervallo per entrambi i gruppi. Gli acidi grassi a catena ramificata isobutirrico, isovalerianico (utilizzati nel calcolo del BCP) e valerianico rappresentano i prodotti finali della degradazione degli aminoacidi valina, leucina e prolina (Van Soest, 1994). Il fatto che non siano emerse differenze statisticamente significative tra i gruppi per questi parametri suggerisce un'analogia attività della degradazione microbica delle proteine (Bovera et al., 2007). Tuttavia, la maggiore quantità in valore assoluto di AGV a catena ramificata (in totale 0.5 vs. 0.4 mmol/l, rispettivamente per i gruppi LAC e controllo), sembra confermare una maggiore attività fermentativa della popolazione microbica ciecale dei conigli del gruppo LAC nei confronti della frazione proteica della dieta. La maggiore quantità di prodotti finali della

degradazione proteica, associata a una maggiore produzione di catene carboniose, provenienti dalla fermentazione dei carboidrati strutturali e non strutturali, permetterebbe una maggiore disponibilità di “materie prime” per la sintesi di nuovi amminoacidi e quindi di nuove proteine ad opera dei batteri. Questo potrebbe avere come conseguenza una più numerosa popolazione microbica ciecale oppure una sua più efficiente attività fermentativa. Nei conigli in accrescimento, Amber et al. (2004) hanno evidenziato effetti positivi sull’incremento ponderale giornaliero (+9.6% per il gruppo di controllo) e sull’indice di conversione alimentare (-6.5%) utilizzando *L. acidophilus*, mentre nessun effetto è stato osservato sulla percentuale di mortalità. Gli stessi autori hanno riscontrato una migliore digeribilità dei nutrienti, in particolare della cellulosa, dovuta ad una modifica della microflora cecale, risultante in un aumento del conteggio dei batteri cellulolitici (CFU/ml). Come detto, nelle ultime due settimane (22-35 giorni) non è stato possibile misurare l’ingestione di latte e di alimento solido dei coniglietti, ma crediamo che l'aumento della produzione di AGV totali nel contenuto ciecale nel gruppo LAC non sia attribuibile ad una maggiore ingestione di alimento: infatti considerando il consumo di latte simile in entrambi i gruppi fino a 21 giorni di età, e l’incremento peso ponderale giornaliero registrato non differente tra i due gruppi nel periodo 22-35 giorni, (in media 36.1 vs. 33.4 g/d, rispettivamente per i gruppi CONT e LAC), è verosimile supporre che non vi sia stata nessuna differenza nell’ingestione di alimento solido tra due gruppi.

L'effetto del trattamento spray con lattobacilli sui parametri ematologici dei coniglietti è apparso molto interessante. In particolare, sono da mettere in evidenza le differenze tra i gruppi per quanto riguarda le diverse frazioni dei globuli bianchi. A questo proposito, bisogna sottolineare che i leucociti giocano un ruolo importante nella modulazione della risposta immunitaria, difendendo l’organismo dalle infezioni (Schalm et al., 1975). Tuttavia, la conta dei leucociti totali da sola non può dare informazioni specifiche ma è necessario un conteggio separato delle diverse frazioni che li compongono. Nella nostra prova, la conta differenziale dei leucociti ha messo in evidenza un maggior contenuto di neutrofili nel gruppo di controllo; i neutrofili sono responsabili della fagocitosi dei microrganismi patogeni nelle ore che seguono il primo contatto con i tessuti interni del’organismo ospite. Nessuna differenza significativa è stata rilevata nella conta dei basofili e dei monociti tra i gruppi in esame. Il numero dei basofili aumenta in seguito alla sensibilizzazione di un antigene (o allergene), mentre i monociti sono responsabili della difesa dei tessuti contro gli agenti microbici (Schalm et al, 1975.; Cheesbrough, 1991). La conta dei linfociti dei conigli trattati con *Lactobacillus plantarum* è risultata più elevata rispetto al gruppo di controllo. Il ruolo primario dei linfociti è la formazione degli anticorpi per l’immunità umorale e cellulare (Schalm et al, 1975; Baker e Argento, 1985). Quindi in sostanza, l'aumento della percentuale di linfociti nei conigli del gruppo LAC, sembra indicare un effetto immunostimolante del probiotico utilizzato Aattouri et al.

(2001) riportarono che l'assunzione per via orale di batteri lattici nei ratti, provoca un aumento della proliferazione dei linfociti e produzione dell'interferone A. Effetti simili sulla formula leucocitaria sono stati riportati da Aboderin et al. (2006), che hanno utilizzato *L. plantarum* nei ratti. Probabilmente, questa immuno-stimolazione può essere alla base della bassa mortalità registrata nel gruppo LAC. Il gruppo CONT ha presentato maggior numero di globuli rossi, emoglobina ed ematocrito, ma è importante osservare che i valori misurati rientrano nel range fisiologico (soltanto l'ematocrito è leggermente più elevato) dei conigli nel post svezzamento; tali valori, infatti, come riportato da Archetti et al. (2008) sono i seguenti: globuli rossi $3.5-6.6 \times 10^6 \times \mu\text{L}$; emoglobina 6.7-12.7 g/dL, ematocrito 18.9- 34.7%. Studi sui polli (Koenen et al., 2004) hanno mostrato un positivo incremento delle cellule linfocitarie utilizzando *Lactobacillus* come probiotico. Nel nostro studio, il *L. plantarum* è stato identificato nel contenuto ciecale di giovani conigli del gruppo LAC, ma non negli animali del gruppo controllo. Il numero di colonie isolate nel contenuto ciecale (1.25×10^6 CFU/g) è sufficiente determinare effetti sugli animali: infatti, secondo Guillot (2001), gli organismi probiotici devono raggiungere concentrazioni nell'ordine di 10^6-10^7 CFU per g nel contenuto intestinale per poter manifestare un qualsiasi tipo di effetto. La nostra ipotesi è che nei conigli appena nati, essendo il pH dello stomaco elevato (5-6) il *L. plantarum* riesce a superare il tratto gastrico e colonizzare il grosso intestino, con effetti positivi sulla salute animali. Probabilmente, i livelli adeguati di colonizzazione sono da imputare al metodo di somministrazione dei lattobacilli poiché lo spray evita i problemi derivanti dalla somministrazione tramite acqua di bevanda o mangimi. Infatti, in quest'ultimo caso, le temperature raggiunte durante il procedimento di pellettatura possono inattivare il batterio, e a questo effetto sono particolarmente sensibili i microrganismi non formanti spore come *Lactobacillus*, *Pedicoccus* e *Streptococcus* (Falcao et al., 2007).

7.CONCLUSIONI

La somministrazione di *Lactobacillus plantarum* mediante spray durante il periodo di allattamento (1 - 35 giorni di età) non ha modificato la velocità di accrescimento dei coniglietti, ma ha ridotto il tasso di mortalità, ha potenziato il sistema immunitario e, nel complesso, ha migliorato lo stato sanitario dell'apparato digerente degli animali. Gli effetti osservati sono probabilmente da imputare alla modificazione della popolazione batterica del cieco, che, negli animali del gruppo trattato è stata caratterizzata dalla presenza di *L. plantarum* nel contenuto ciecale.

8.BIBLIOGRAFIA

Aattouri, N., Bouras, M., Tome, D., Marcos, A., Lemonnier, D., 2001. Oral ingestion of lactic acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon production. *Brit. J. Nutr.* 87:367-373.

Aboderin, F.I., Oyetayo, V.O., 2006. Haemato-logical Studies of Rats Fed Different Doses of Probiotic, *Lactobacillus plantarum*, Isolated from Fermenting Corn Slurry. *Pak. J. Nutr.* 5:102-105.

Abo-El-Khair, I.A.A., Awny, N., 1993. Influence of feeding *Lactobacillus acidophilus* cells on serum cholesterol levels of rabbits. *Egypt. J. Microbiol.* 28:259-269.

Amber, K.H., Yakout, H.M., Hamed Rawya, S., 2004. Effect of feeding diets containing yucca extract or probiotic on growth, digestibility, nitrogen balance and caecal microbial activity of growing New Zealand white rabbits. pp 737-741 in *Proc. 8th World Rabbit Congr.*, Puebla, Mexico.

AOAC, 2004. *Official Methods of Analysis*. 17th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.

Archetti, I., Tittarelli, C., Cerioli, M., Brivio, R., Grilli, G., Gavazza, A., 2008. Serum chemistry and hematology values in commercial rabbits: preliminary data from industrial farm in Northern Italy. pp 1147-1151 in *Proc. 9th World Rabbit Congr.*, Verona, Italy.

Baird, D.M., 1977. Probiotics help boost feed efficiency. *Feedstuffs* 49:11-12.

Baker, F.J., Silver, R.E., 1985. *Introduction to medical laboratory technology*. 6th ed., Butterworths Ed., London, UK.

Bertazzoni, M.E., Benini, A., Marzotto, M., Hendriks, H., Sbarbati, A., Dellaglio, F., 2001. Preliminary screening of health-promoting properties of new *Lactobacillus* strain: in vitro and in vivo. *HEALFO Eur. Conf. on food and nutrition for better health: highlights from EC research*, Santa Maria Imbaro - Lanciano, Italy.

Bovera, F., D'Urso, S., Calabrò, 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*). *Brit. Poultry Sci.* 48:354-362.

Carabano, R., Piquer, J., 1998. The digestive system of the rabbit. In: C. de Blas and J. Wiseman (eds.) The nutrition of the rabbit. CABI Publ., Wallingford, UK.

Casas, I.A., Dobrogosz, W.J., 2000. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad spectrum protection against disease in humans and animals. *Microb. Ecol. Health D.* 12:247-285.

Chang, H., Kim, J., Kim, H., Kim, W., Kim, Y., Park, W., 2001. Selection of potential probiotic lactobacillus strain and subsequent in vivo studies. *Anton. Leeuw. J. Microb.* 80:193-199.

Cheesborough, M., 1991. Medical laboratory manual for tropical countries, Vol. 1. 2nd ed., Butterworth Ed., London, UK.

Das, T., Gireesh, T., Shankar, P.A., 1997. Identification of lactobacilli producing antibacterial compounds isolated from animals and chicken. *Indian J. Dairy Biosci.* 8:13-16.

de Waard, R., Garssen, J., Snel, J., Bokken, G.C.A.M., Sako, T., Huis in 't Veld, J.H.J., Vos, J.G., 2001. Enhanced antigen-specific delayed-typed hypersensitivity and immunoglobulin G2b responses after oral administration of viable *Lactobacillus casei* YIT9029 in wistar and brown Norway rats. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 8:762-767.

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

Fann, M.K., O'Rourke, D., 2001. Normal bacterial flora of the rabbit gastrointestinal tract: a clinical approach. *Semin. Avian Exot. Pet* 10:45-47.

FAO/WHO, 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Available from: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf

Gidenne, T., Carabano, R., Garcia, J., de Blas, C., 1998. Fibre digestion. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) The nutrition of the rabbit. CABI Publ., Wallingford, Oxon, UK, pp 69- 88.

- 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. CIHEAM-IAMZ Publ., Zaragoza, Spain, pp 17-21.
- Koenen, M.E.**, Kramer, J., Van Der Hulst, R., Heres, L., Jeurissen, S. H. M., Boersma, W. J. A., 2004. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer- and meat-type chickens. *Brit. Poultry Sci.* 45:355-366.
- Maertens, L.**, Falcão-e-Cunha, L, Marounek, M., 2006. Feed additives to reduce the use of antibiotics. In: L. Maertens and P. Coudert (eds.) Recent advances in rabbit science. ILVO Ed., Melle, Belgium, pp 259-265.
- Martignon, M.H.**, 2010. Consequences of a feed intake control on digestive physiopathology and on feeding behaviour . PhD thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse, p. 194
- Oyetayo, V.O.**, Adetuyi, F.C., Akinyosoye, F.A., 2003. Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo. *Afr. J. Biotechnol.* 2:448-452.
- SAS**, 2000. Users Guide: Statistics. SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA.
- Schalm, O.W.**, Jain, N.C., Carrol, E.J., 1975. Veterinary haematology. 3rd ed., Lea and Febiger Publ., Philadelphia, PA, USA.
- Schneitz, C.**, Nuotio, L., 1992. Efficacy of different microbial preparations for controlling *Salmonella* colonisation in chicks and turkey poults by competitive exclusion. *Brit. Poultry Sci.* 33:207-211.
- Tannock, G.W.**, 1983. The effect of dietary and environmental stress on the gastrointestinal microflora. In: D.J. Hentges (ed.) Health and Disease. Academy Press, New York, NY, USA, pp 517-539.
- Van Soest, P.J.**, 1993. Cell wall matrix interactions and degradation – Session synopsis. In: H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield and J. Ralph (eds.) Forage cell wall structure and digestibility. ASA-CSSA-SSSA Publ., Madison, WI, USA.

Van Soest, P.J., 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd ed., Comstock Publ., Ithaca, NY, USA.

Wolfenden, A.D., Pixley, C.M., Higgins, J.P., Higgins, S.E., Vicente, J.L., Torres- Rodriguez, A., Hargis, B.M., Tellez, G., 2007. Evaluation of spray application of a lactobacillus- based probiotic on salmonella enteritidis colonization in broiler chickens. *Int. J. Poultry Sci.* 6:493-496.

Yu, B., Tsen, H., 1993. Lactobacillus cells in the rabbit digestive tract and the factors affecting their distribution. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 269-275.

Capitolo 5

EFFETTO DELLA RESTRIZIONE IDRICA SULLE PERFORMANCE DI ACCRESCIMENTO, SULLA DIGERIBILITA' DEI NUTRIENTI DELLA DIETA SULLE CARATTERISTICHE DI FERMENTAZIONE CIECALE E SU ALCUNE CARATTERISTICHE DELLE CARCASSE E DELLE CARNI DI CONIGLIO

1.OBIETTIVO DEL LAVORO

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di studiare l'effetto di uno specifico programma di restrizione idrica, applicata durante il periodo invernale dallo svezzamento (35giorni) fino a 60 giorni di età, sulle performance di accrescimento, sulla digeribilità dei nutrienti, sulle caratteristiche di fermentazione ciecale e, infine, su alcune caratteristiche delle carcasse e delle carni di coniglio.

2.MATERIALI E METODI

Tutte le procedure che hanno coinvolto animali vivi sono state condotte secondo le leggi italiane che regolano il benessere degli animali utilizzati in prove scientifiche.

Lo studio è stato condotto in un'azienda privata di conigli da carne (Benevento, Italia, 41 ° 16'0 "N, 14 ° 55'0" E, e 667 m sul livello del mare), nei mesi di gennaio-febbraio 2011.

Sono stati utilizzati 1388 conigli ibridi Hylasvezzamenti (35 giorni di età) che presentavano un peso vivo medio di 954.3 ± 67 g. Gli animali sono stati omogeneamente divisi per peso vivo e sesso in 2 gruppi, accasati nello stesso capannone in gabbie bicellulari (26 x 46 x 35 cm). Per ogni gruppo sono state utilizzate 347 gabbie (2 conigli per gabbia; 1 maschio e 1 femmina per gabbia). I 2 gruppi sono stati alimentati con le stesse diete somministrate *ad libitum*, nel periodo post-svezzamento (35-60 giorni) e nel periodo di finissaggio (61-84 giorni di età). Dei due gruppi, uno ha ricevuto acqua di bevanda *ad libitum* (gruppo AL), mentre l'altro ha avuto un accesso limitato all'acqua di bevanda (RES) nel periodo post-svezzamento (35-60 giorni di età). Il numero di ore in cui gli animali avevano disponibilità di acqua sono state progressivamente aumentate in funzione dell'aumento dell'età e del peso degli animali, secondo il seguente programma: nella prima settimana post-svezzamento (35-41 giorni di età) 2h/giorno (9:00 - 11:00); nella seconda settimana (42 - 48 giorni di età) 2.5 h/giorno (9:00 - 11.30); nella terza settimana (49-55 giorni di età) 3 h/giorno (9:00 - ore 12) e, infine, nella quarta settimana (da 56-60 giorni) 4 h/giorno (9:00 - 13:00). Durante il periodo di finissaggio entrambi i gruppi hanno potuto liberamente accedere all'acqua di bevanda nella 24 ore.

Nel corso della prova, il tasso di mortalità nei due gruppi è stato registrato quotidianamente. I pesi vivi individuali e l'ingestione di alimento per ogni gabbia sono stati registrati settimanalmente su 32 gabbie scelte a caso in ogni gruppo (64 conigli per gruppo), allo scopo di calcolare l'incremento

ponderale giornaliero (IPG), l'ingestione di alimento giornaliera (IMG), e l'indice di conversione alimentare (ICA). Quotidianamente, eventuali conigli morti sono stati rimossi, e le gabbie coinvolte sono state escluse dalla prova.

I coefficienti di digeribilità apparente della sostanza organica (SO), proteina grezza (PG), estratto etereo (EE), fibra grezza (FG), NDF, ADF, cellulosa, emicellulosa sono stati determinati utilizzando le ceneri acido insolubili (CAI) con marker inerte (Vogtmann et al., 1975). Le feci dure sono state raccolte durante 3 giorni consecutivi (58-59-60 giorni di età), mediante reti di nylon (con maglie da 5 x 7 mm) poste sotto le gabbie utilizzate per i rilievi delle performance di accrescimento (32 gabbie/gruppo). L'utilizzo delle reti ha permesso la separazione delle feci dalle urine. Alla fine di ogni giorno, le feci raccolte da ogni gabbia, dopo allontanamento dell'ciocotrofo presente, sono state essiccate in una stufa a ventilazione forzata a 60° C fino al raggiungimento di un peso costante. Per ciascuna gabbia, le feci essiccate provenienti dai 3 giorni di raccolta sono state miscelate e un campione di circa 100 g è stato prelevato per effettuare l'analisi chimica e il dosaggio delle CAI. La digeribilità apparente dei nutrienti è stata calcolata come segue: $100 - 100 \times [(\% \text{CAI nella dieta di svezzamento} / \% \text{CAI nelle feci}) \times (\% \text{nutrienti nelle feci} / \% \text{nutrienti nella dieta di svezzamento})]$.

All'età di 62 giorni, 15 conigli per gruppo sono stati sacrificati e il contenuto ciecale è stato prelevato, posto in contenitori sterili ed ermeticamente chiusi, collocati 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 ciecale (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, 30m x 0.25mm x 0.25mm 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 blu, misurata alla lunghezza d'onda di 623 nm, risulta proporzionale alla concentrazione di NH₃ nel campione.

Tutti gli animali sono stati macellati a 84 giorni di età. I relativi rilievi sulle carcasse sono stati effettuati scegliendo 16 conigli per gruppo (8 maschi e 8 femmine) in modo che i pesi alla macellazione dei due gruppi risultassero simile, per evitare errori nella valutazione della qualità delle carcasse dovute alle differenze di peso. Le procedure utilizzate per misurare la qualità delle carcasse sono state quelle previste del protocollo della World Rabbit Science Association, descritte da Blasco e Ouhayoun (1996). I conigli, macellati, sono stati dissanguati e successivamente si è proceduto alla rimozione dell'intero tratto gastrointestinale, della pelle, degli arti distali e coda, e di tutto il tratto urogenitale compresa la vescica vuota. Le carcasse sono state pesate e poi refrigerate a 4° C per 24 ore in una camera ventilata. Dopo 24 h di refrigerazione, le carcasse sono state nuovamente pesate, e successivamente si è proceduto alla rimozione di testa, fegato, cuore, polmoni, esofago, trachea, timo, rene (privo di grasso perirenale) per ottenere il peso della carcassa di riferimento. Dalla carcassa di riferimento sono stati separati gli arti posteriori sinistri.

2.1.Criteri fisici

Con uno pHmetro portatile (modello HI 9025; Hanna Instruments, Woonsocket, RI) dotato di uno specifico elettrodo (FC 230C; Hanna Instruments) è stato misurato il pH del muscolo bicipite femorale sulla carcassa dopo 24 h di refrigerazione. L'arto posteriore sinistro è stato utilizzato per valutare la percentuale di carne, ossa e grasso. Il rapporto carne-ossa è stato calcolato come segue: carne/osso = (peso dell'arto posteriore crudo - peso ossa) / peso ossa.

Il colore della carne è stato misurato utilizzando un colorimetro (Minolta CR-300, illuminante D65 e 0 ° osservatore; Minolta Camera Co., Osaka, Giappone) mediante il metodo Hunter-Lab; su ogni campione sono state eseguite 3 misurazioni a tre diverse angolazioni (ruotando ogni volta di 90°) e ripetendo la procedura in 3 aree diverse del muscolo. Lo strumento, prima di eseguire le analisi è stato tarato su una piastrina bianca standard fornita in dotazione con lo strumento ($Y = 92.8$, $x = 0.3162$, e $y = 0.3322$). Le misure colorimetriche sono state effettuate 24h dopo la morte su dei campioni di carne sezionati dalla carcassa di riferimento su una superficie di taglio fresca fatta nel centro anatomico del muscolo bicipite femorale. La media aritmetica delle 9 registrazioni ottenute dal campione di muscolo è stata sottoposta ad analisi statistica.

Il grado di tenerezza è stato testato misurando la forza di resistenza al taglio (Warner-Bratzler Shear Force, WBSF) su campioni crudi di bicipite femorale. La WBSF è stata misurata mediante apparecchio Instron 1140 (Instron, High Wycombe, UK), utilizzando una velocità di taglio di 50

mm/min e una cella di carico di 50 N. Il campione sottoposto ad analisi è stato opportunamente tagliato in forma cilindrica, con un taglio parallelo alle fibre muscolari e un diametro di 1.27 cm. La registrazione della forza esercitata dalla lama per tagliare il campione è stata riportata su di un grafico bidimensionale carico-spostamento dando luogo al tipico tracciato tissuometrico. Da tale curva, tramite opportuni calcoli, si sono ottenuti durezza e resistenza. Le forze di taglio sono state applicate perpendicolarmente alla direzione delle fibre muscolari. Ogni campione è stato analizzato in triplicato e la media aritmetica delle registrazioni ottenute da ciascun campione è stata sottoposta ad analisi statistica.

2.2.Criteri chimici

Le analisi chimiche delle diete di base e delle feci sono state effettuate utilizzando i seguenti protocolli proposti dall' AOAC (2004): sostanza secca ,metodo 934,01; estratto etereo,metodo 920,39; ceneri, metodo 942,05; proteine grezze, metodo 954,01; fibra grezza, metodo 945,18; ADF e ADL, metodo 973,18; NDF, metodo 2.002,04. L'energia digeribile (ED) della dieta è stata calcolata secondo l'equazione proposta da Xiccato (1989): $ED = 13.68 - 0.2472 \times FG$, dove ED è l' ED apparente (MJ/kg) e FG è il contenuto di fibra grezza espresso in percentuale sul tal quale. Il valore di ED ottenuto è stato moltiplicato per 239 per convertire i MJ in kcal/kg. Il contenuto di cellulosa ed emicellulosa sono stati calcolati, rispettivamente, come: ADF - ADL e NDF - ADF.

La carne cruda dissezionata dall'arto posteriore sinistro è stata macinata e successivamente liofilizzata, e analizzata utilizzando la seguente procedure AOAC (1984): umidità, metodo 950,46; grassi, metodo 930,27); ceneri, metodo 950,153. Il contenuto proteico, comprese le molecole glucidiche e i loro cataboliti (0,25%;. Ouhayoun et al, 1990), è stato calcolato per differenza.

I lipidi totali sono stati estratti mediante omogeneizzazione con cloroformio/metanolo, da campioni di carne provenienti dall artto posteriore sinistro, secondo il protocollo Folch et al. (1957).La determinazione della composizione acidica dei grassi della carne è stata effettuata mediante gas cromatografia, previa transesterificazione degli esteri metilici degli acidi grassi con e HCl 3% in metanolo (vol/vol) in accordo con Christie *et al.* (2001). Il gas cromatografo utilizzato (CE 8000 Top, Thermoquest, Milan, Italy) era dotato di una colonna capillare (Supelco, OMEGAWAX 250 capillary fused silica, 30m, 0.25mm, 0.25µm film thickness) e 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 (velocità lineare: 40.22 centimetri/sa 200 ° C).

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).

I risultati sono stati espressi in percentuale (peso/peso) sul totale degli acidi grassi degli esteri metilici. Gli indici aterogenico e trombogenerico sono stati calcolati secondo Ulbricht e Southgate (1991) come segue:

Indice aterogeno

$$= (C12 : 0 + 4 \times C14 : 0 + C16 : 0) / \left[\sum \text{MUFA} + \sum (n - 6) + \sum (n - 3) \right]$$

Indice trombogenerico

$$= (C14 : 0 + C16 : 0 + C18 : 0) / \left[0.5 \times \sum \text{MUFA} + 0.5 \times \sum (n - 6) + 3 \times \sum (n - 3) + \sum (n - 3) / \sum (n - 6) \right]$$

acido laurico =(C12:0)

acido miristico =(C14:0)

acido palmitico =(C16:0)

acido oleico =(C18:1)

acido stearico (C18:0)

M' = altri monoinsaturi

ω -3 e ω -6 = polinsaturi delle rispettive serie.

3.ANALISI STATISTICA

I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante ANOVA, utilizzando la procedura GLM (SAS Inst. Inc., Cary, NC). L'unità sperimentale è stata la gabbia . Il modello utilizzato ha incluso l'effetto fisso della distribuzione dell'acqua, e l'effetto random della gabbia. Le differenze le media sono state valutate mediante il Tukey test. Le differenze tra le percentuali di mortalità sono state analizzate mediante il χ^2 test.

4.RISULTATI

In Tabella 1 si riportano gli ingredienti e la composizione chimico-nutrizionale delle diete utilizzate nel corso della prova.

La percentuale di mortalità nel periodo compreso tra 35 e 60 giorni di età dei coniglietti è risultata più elevata ($P < 0.0001$) nel gruppo AL (10.1 vs. 5.2%). Nel periodo compreso tra 61 e 84 giorni di età (finissaggio) non si è verificata mortalità in nessuno dei due gruppi. In ogni caso, come

conseguenza della mortalità verificatasi in entrambi i gruppi, alcune gabbie rimaste vuote o con un solo coniglietto, sono state escluse dalla prova. Di conseguenza il numero delle gabbie utilizzate per l'elaborazione statistica dei risultati è stata di 29 e 31, rispettivamente per i gruppi AL e RES.

Tabella 1. Materie prime e composizione chimica delle diete utilizzate nei conigli in prova

	%	
	Dieta di svezzamento	Dieta di "finissaggio"
<i>Costituenti della dieta</i>		
Erba medica disidratata, 17 % Proteina grezza	32.0	31.0
Cruschello di frumento	29.0	30.0
Fieno di erba medica	12.0	11.0
Mais	10.0	10.0
Farina di girasole 30 % Proteina grezza	8.0	8.0
Sugar cane molasses	4.0	4.0
Farina di soia tostata, 44 % Proteina grezza	3.0	3.0
Carbonato di calcio	1.0	1.0
Olio di soia	-	1.0
Sale	0.50	0.50
Vitamine-Minerali premix ¹	0.50	0.50
<i>Composizione chimica in, % di Sostanza Secca</i>		
Sostanza secca della dieta	88.67	89.12
Ceneri	8.62	8.35
Proteina Grezza	17.02	16.59
Estratto etero	2.86	4.60
Fibra grezza	18.52	15.35
NDF	42.30	38.20
ADF	22.80	19.54
ADL	5.27	5.09
Cellulosa	17.53	14.45
Emicellulosa	19.50	18.66
Energia Digeribile, Kcal/kg Sostanza secca	2,298	2,462

Micro costituenti per kg di dieta: "svezzamento" Dieta: vitamina A, 8,375 IU; vitamina D3, 1000 IU; vitamina E, 20 mg; vitamina K3, 1 mg; vitamina B1, 1 mg; vitamina B2, 2 mg; vitamina B6, 1 mg; acido nicotinic, 20 mg; cloruro di colina, 250 mg; magnesio, 290 mg; manganese, 20 mg; zinco, 60 mg; iodio, 1.25 mg; ferro, 26 mg; rame, 10 mg; cobalto, 0.7 mg. "finissaggio" dieta: vitamina A, 6,375 IU; vitamina D3, 750 IU; vitamina E, 20 mg; vitamina K3, 1 mg; vitamina B1, 1 mg; vitamina B2, 2 mg; vitamina B6, 1 mg; acido nicotinic, 20 mg; choline chloride, 250 mg; magnesio, 290 mg; manganese, 20 mg; zinco, 60 mg; iodio, 1.25 mg; ferro, 26 mg; rame, 10 mg; cobalto, 0.7 mg.

La tabella 2 mostra le performance produttive dei coniglietti registrate nel periodo sperimentale. L'accesso limitato all'acqua potabile ha ridotto significativamente l'ingestione di alimento nel periodo compreso tra 35 e 60 giorni di età, in ragione di circa 24 g/coniglio/giorno. Dopo i 60 giorni di età fino alla macellazione, periodo in cui l'accesso all'acqua è stato *ad libitum* in entrambi i gruppi, nessuna differenza si è riscontrata per l'ingestione volontaria di alimento. Considerando l'intero periodo sperimentale (35-84 giorni di età), l'ingestione di alimento è significativamente risultata più elevata ($P < 0.05$) gruppo AL. L'incremento ponderale giornaliero è risultato più elevato nel gruppo AL durante il periodo post-svezzamento ($P < 0.01$) e considerando l'intero

periodo della prova ($P < 0.05$). Non sono state osservate differenze tra i gruppi durante il periodo di finissaggio. L'indice di conversione alimentare è risultato significativamente più favorevole ($P < 0.05$), durante il periodo di finissaggio (61-84 giorni) per il gruppo RES.

Tabella 2. Prestazioni in vivo registrate nei due gruppi trattati durante la prova.

	Water restricted	Ad libitum	SEM	P-value
Peso corporeo, g				
35 d	961.5	947.0	13.65	0.4564
60 d	1742.8 ^B	1902.0 ^A	10.78	0.0084
84 d	2528.3 ^B	2636.6 ^A	24.11	0.0052
Incremento di peso corporeo, g/d				
35-60 d	31.25 ^B	38.20 ^A	0.59	0.0026
61-84 d	32.73	30.61	1.15	0.1982
35-84 d	31.99 ^b	34.41 ^a	0.63	0.0137
Consumo di alimento, g/d				
35-60 d	112.1 ^B	135.7 ^A	1.88	<0.0001
61-84 d	168.7	175.9	2.25	0.0897
35-84 d	140.3 ^b	155.8 ^a	1.52	0.0325
Indice di conversione alimentare, g/g				
35-60 d	3.59	3.55	0.094	0.1232
61-84 d	5.15 ^b	5.75 ^a	0.078	0.0321
35-84 d	4.39	4.53	0.110	0.0920

SEM = errore standard medio; A, B: $P < 0.01$; a, b: $P < 0.05$

I coefficienti di digeribilità riportati in Tabella 3 indicano che i conigli con il libero accesso all'acqua potabile hanno presentato una minore digeribilità di sostanza secca, sostanza organica, NDF, ADF e cellulosa.

Tabella 3 Digeribilità apparente(%) dei nutrienti dei due gruppi di conigli in prova

	Water restricted	Ad libitum	SEM	P value
Sostanza secca	61.78 ^A	59.04 ^B	0.61	0.0064
Sostanza organica	62.17 ^A	59.54 ^B	0.62	0.0091
Proteina grezza	76.61	77.49	0.42	0.1593
Estratto etereo	73.21	73.38	1.10	0.9197
NDF	36.67 ^a	33.30 ^b	1.11	0.0488
ADF	32.84 ^A	27.58 ^B	1.02	0.0027
Cellulosa	35.28 ^a	31.34 ^b	1.18	0.0317
Emicellulosa	41.62	40.67	1.74	0.7077

SEM = errore standard medio; A, B: P < 0.01; a, b: P < 0.05

La produzione di acidi grassi volatili misurata nel contenuto ciecale ed espressa in mmol/l (Tabella 4) mette in evidenza che i coniglietti del gruppo sottoposto a restrizione idrica hanno presentato, a 60 giorni di età, una più elevata (P < 0.01) produzione di AGV totali, dovuta principalmente a maggiori produzioni di acetato, isobutirrato e acido isovalerianico. Di conseguenza, il BCP (Tabella 4) è risultato più elevato (P < 0.01) nel gruppo RES. La produzione di ammoniaca, invece, (Tabella 4) è risultata più elevata (P < 0.05) nel gruppo AL:

Tabella 4. Livelli di acidi grassi volatili e ammoniaca (mmol/l) misurati e valore del Branched Chain Proportion (BCP) calcolato nei due gruppi di conigli in prova

	RES	AL	SEM	P
Acetato	87.38 ^A	72.50 ^B	1.09	0.0001
Propionato	9.24	8.71	0.20	0.2605
Butirrato	17.31	16.74	0.47	0.5967
Isobutirrato	1.52 ^A	1.17 ^B	0.02	0.0001
Isovalerianico	1.71 ^A	1.34 ^B	0.01	0.0001
Valerianico	1.36	1.26	0.09	0.6307
Totale	118.5 ^A	101.7 ^B	1.37	0.0002
BCP	0.027 ^A	0.025 ^B	0.003	0.0079
Ammoniaca	10.59 ^b	13.76 ^a	0.24	0.0232

RES = gruppo sottoposto a restrizione alimentare; AL = gruppo alimentato ad libitum. A, B = P < 0.01; a, b = P < 0.05; SEM = errore standar medio.

In Tabella 5, la produzione degli AGV è stata invece espressa come percentuale sulla produzione totale. In questo caso si mette in evidenza come il gruppo RES mostri più elevate produzioni di acetato ($P < 0.01$), di isobutirrato e di isovalerianico ($P < 0.05$) mentre più basse appaiano le percentuali di acido butirrico ($P < 0.05$).

Tabella 5. Proporzione molare (%) dei diversi acidi grassi volatili nei due gruppi di conigli in prova

	RES	AL	SEM	P
Acetato	73.70 ^A	71.27 ^B	0.38	0.0135
Propionato	7.81	8.57	0.17	0.0667
Butirrato	14.60 ^b	16.45 ^a	0.38	0.0490
Isobutirrato	1.28 ^a	1.15 ^b	0.02	0.0118
Isovalerianico	1.44 ^a	1.32 ^b	0.02	0.0341
Valerianico	1.15	1.24	0.09	0.6173

RES = gruppo sottoposto a restrizione alimentare; AL = gruppo alimentato ad libitum.

A, B = $P < 0.01$; a, b = $P < 0.05$; SEM = errore standar medio

La tabella 6 riporta le caratteristiche delle carcasse registrate nei conigli di entrambi i gruppi. Le percentuali di grasso perirenale e scapolare sono risultate significativamente più alte ($p < 0,01$) nei conigli del gruppo AL.

Tabella 6 Trattati della carcassa dei due gruppi di conigli alla macellazione (84 giorni di età)

	Restrizione idrica	Ad libitum	SEM	P-value
PC , g	2.547	2.555	23.6	0.4287
Pelle, %PC	15.2	15.4	0.19	0.8954
GUT, % PC	21.2	19.7	0.76	0.5421
Resa a caldo, %	59.3	60.1	0.65	0.6387
Resa dopo refrigerazione %	59.0	59.9	0.65	0.3215
pHBF1	6.96	6.98	0.03	0.8918
Carcassa di riferimento (CR)	1.239	1.217	35.8	0.3954
fegato, %CR	6.55	6.56	0.31	0.7512
Rene, %CR	1.35	1.27	0.05	0.2143
Cuore*, % CR	2.00	2.08	0.09	0.6247
Testa, %CR	11.4	11.4	0.48	0.9514
Lunghezza carcassa, cm	32.7	32.4	0.41	0.6123
Circonf. carcassa, cm	19.0	18.9	0.33	0.7682
Grasso perirenale, % CR	1.29 ^B	1.68 ^A	0.01	0.0032
Grasso inguinale, % CR	0.54	0.53	0.04	0.5028
Grasso scapolare, % CR	0.61 ^B	1.28 ^A	0.03	0.0001

GUT = tratto gastro intestinale; pHBF1 = pH del muscolo bicipite femorale misurato 1 h dopo macellazione; * = significa che tutto il cuore, polmoni, esofago, trachea, timo; SEM = errore standard medio; A, B: P < 0.01

Le caratteristiche fisiche delle carcasse, come la composizione dell'arto posteriore sinistro, incluso il rapporto carne-ossa non sono stati influenzati dai trattamenti dietetici (**Tabella 7**).

Tabella 7 Caratteristiche fisiche della carne dell'arto posterior sinistro

	Water restricted	Ad libitum	SEM	P-value
L*	49.47	50.95	0.79	0.1077
a*	4.84	5.05	0.33	0.6533
b*	1.92	2.14	0.14	0.2912
pH	5.69	5.68	0.02	0.8661
Arto post. sx (LHL)	184.5	173.8	5.61	0.1976
Osso, % LHL	22.73	21.19	1.14	0.3661
Grasso, % LHL	2.05	2.06	0.25	0.9934
Carne, % LHL	75.22	76.76	1.10	0.3407
Rapporto carne osso	3.38	3.74	0.26	0.3509
WBSF, kg	0.42	0.45	0.09	0.5532

WBSF = Warner-Bratzler shear force; SEM = errore medio standard

Anche per quanto riguarda la composizione chimica della carne di coniglio (**Tabella 8**) non ci sono state differenze tra i due gruppi in esame.

Tabella 8. Composizione chimica (g/100 g) e perdite di congelamento dell'arto posteriore

	Water restricted	Ad libitum	SEM	P-value
Umidità	72.58	72.79	0.63	0.8140
Proteine	22.47	22.06	0.38	0.4585
Grassi	3.33	3.29	0.17	0.8795
Ceneri	1.16	1.41	0.11	0.2198
Perdite di congelamento	1.25	1.09	0.14	0.4259

SEM = errore medio standard

In **Tabella 9** si riporta il profilo acidico della carne dei conigli in prova. Gli animali del gruppo RES hanno mostrato una più alta percentuale ($P < 0,05$) di C16: 0, e di conseguenza un maggior livello ($P < 0,05$) di Acidi Grassi Saturi rispetto al gruppo AL. L'acido laurico (C12: 1) è stato

significativamente più elevato ($P < 0,01$) nel gruppo RES anche se il totale degli Acidi Grassi Monoinsaturi non è risultato differente tra i due gruppi.

Il totale degli Acidi Grassi Polinsaturi(PUFA) è risultato minore nel gruppo sottoposto a restrizione idrica, anche se gli acidi grassi C20:5 e C22:5 (entrambi acidi grassi della serie n-3) sono risultati significativamente più elevati ($P < 0,01$ e $P < 0,05$, rispettivamente) nel gruppo RES. La carne di coniglio ottenuta dagli animali del gruppo RES ha presentato, inoltre, contenuti percentuali più elevati di acidi grassi della serie n-3 ($P < 0,05$) e un maggiore rapporto tra n3/n6 ($P < 0,05$) rispetto al gruppo AL. Infine, entrambi gli indici aterogenico e trombogenico sono risultati significativamente più elevati ($P < 0,05$) nel gruppo RES.

Tabella 9 Profilo degli acidi grassi (% esteri metilici degli acidi grassi totali) e indici relativi alla salute umana dell' arto posteriore della carne di coniglio

	Restrizione idrica	Ad libitum	SEM	P-value
C12:0	1.11	1.06	0.23	0.8753
C14:0	5.74	5.14	0.27	0.1525
C16:0	32.32 ^a	28.58 ^b	1.06	0.0263
C18:0	0.52	0.57	0.040	0.3682
Totale SFA	39.68 ^a	35.34 ^b	1.19	0.0235
C12:1	0.66 ^A	0.40 ^B	0.053	0.0042
C16:1	9.67	8.79	0.48	0.2253
C18:1	14.79	17.31	1.23	0.1728
Totale MUFA	25.11	26.49	1.28	0.4564
C18:2 n6	30.29	32.86	1.24	0.1682
C18:3 n6	1.79	1.31	0.32	0.3222
C18:3 n3	0.38	0.42	0.047	0.5763
C20:4 n6	0.62	0.47	0.12	0.4176
C20:5 n3	0.58 ^A	0.38 ^B	0.031	0.0008
C22:5 n3	1.37 ^a	1.16 ^b	0.063	0.0328
C22:6 n3	0.57	0.54	0.051	0.6498
Totale PUFA	35.60	37.15	1.10	0.3386
Totale n3	2.90 ^a	2.50 ^b	0.11	0.0346
Totale n6	32.70	34.65	1.08	0.2307
n3/n6	0.090 ^a	0.073 ^b	0.004	0.0243
Indice Aterogenico	0.93 ^a	0.79 ^b	0.036	0.0222
Indice Trombogenico	0.55 ^a	0.47 ^b	0.022	0.0314

SEM = errore medio standard; A, B: P < 0.01; a, b: P < 0.05.

6.DISCUSSIONE

La restrizione idrica si conferma un efficace strumento per ridurre l'ingestione di alimento. Nel nostro studio, l'ingestione di alimento nel gruppo RES è risultata inferiore del 17,4% rispetto al gruppo AL, se si considera il periodo compreso tra 35 e 60 giorni di età e del 9,95% se si considera l'intero periodo sperimentale (35-84giorni). Questo risultato è in linea con quanto riportato da Elmagharbi et al. (2011), che hanno osservato una riduzione nell'ingestione di alimento pari al 19,1% quando l'accesso all'acqua era ridotto a 2 ore al giorno nel periodo compreso tra 35 e 63 giorni di età. Gli stessi autori hanno osservato che l'ingestione di alimento si riduceva del 13,3% nell'intero periodo di accrescimento (35-77 giorni). Anche Boisot et al. (2004) hanno riscontrato una riduzione nell'ingestione di alimento pari al 18% quando l'accesso all'acqua era ridotto a 2 ore al giorno. Nel periodo successivo a quello in cui gli animali sono stati sottoposti a restrizione idrica (periodo di finissaggio) non c'è stato un incremento nell'ingestione di alimento: questo probabilmente è dovuto al fatto che il volume dello stomaco risultava ancora ridotto e non aveva la capacità sufficiente per ingerire maggiori quantità di alimento (Gidenne et al, 2011.). Il tasso di accrescimento dei conigli è risultato ridotto in funzione della riduzione dell'assunzione di alimento, sia nel periodo in cui l'accesso all'acqua è stato limitato che in tutto il periodo della prova, senza un'evidente crescita compensativa nel periodo di finissaggio, quando tutti i conigli hanno avuto libero accesso all'acqua.

L'indice di conversione alimentare più favorevole registrato nei conigli del gruppo RES, nel periodo di finissaggio, può essere correlato ad una migliore digeribilità dei nutrienti. Nel nostro lavoro l'aumento della digeribilità della Sostanza Secca e della Sostanza Organica è legato ad una maggiore digeribilità di NDF e, in particolare della cellulosa, come dimostrato anche dalla maggiore produzione (sia in valore assoluto sia in percentuale sugli AGV totali) di acetato. Diversi autori (Tumova et al, 2004; Di Meo et al, 2007) hanno rilevato che la restrizione alimentare può influenzare la digeribilità dei nutrienti e, in particolare, migliorare la digeribilità della fibra. Nel nostro studio, la digeribilità delle proteine grezze e del estratto etereo non è stata influenzata dalla restrizione alimentare, e per quanto riguarda le frazioni fibrose, la digeribilità dell'emicellulosa, la più facilmente digeribile dei carboidrati non strutturali, non è stata significativamente differente tra i due gruppi. Un recente studio (Martignon et al., 2010) ha riferito che il livello di ingestione di alimento non ha effetti significativi sul numero di batteri che posseggono copie di 16S rDNA per grammo di contenuto cecale. Tuttavia, come osservato da Gidenne et al. (2011), lo studio della

popolazione batterica è stata effettuata attraverso un'analisi dei profili CE-SSCP che ha tenuto solo conto delle principali popolazioni batteriche. Quindi, è possibile che la riduzione nell'ingestione di alimento, oltre a determinare un elevato tempo di ritenzione dell'alimento a livello intestinale (Gidenne et al., 2011), possa avere inciso sulla popolazione microbica ciecale e/o attività, con un conseguente incremento della digeribilità intestinale della cellulosa. A questo proposito, se si tiene conto delle produzioni di acidi grassi volatili e di ammoniaca misurati sul contenuto ciecale dei conigli in prova, le differenze risultano quanto mai evidenti. Infatti, la microflora ciecale dei conigli sottoposti a restrizione alimentare è in grado di effettuare fermentazioni più intense (maggiore produzione di AGV totali) a causa, verosimilmente, di una maggiore attività fermentativa o di un maggior numero di batteri. La maggiore attività di fermentazione si esplica essenzialmente sulla componente fibrosa della dieta (maggiore produzione di acetato) ma anche sulla frazione proteica. Infatti, il gruppo RES presenta un maggior valore del BCP, che è un indice della degradazione proteica: a pari qualità di proteina fermentata (stessa dieta) il più elevato valore di BCP sta ad indicare una maggiore degradazione di alcuni amminoacidi e, quindi, una maggiore degradazione proteica (Bovera et al., 2007). Anche l'ammoniaca è un indice della degradazione proteica, tuttavia, mentre gli acidi grassi a catena ramificata sono dei prodotti finali, l'ammoniaca può essere utilizzata dalla microflora batterica in combinazione con le catene carboniose derivanti dalle fermentazioni dei carboidrati (di riserva e di struttura) per costruire nuove proteine. Il fatto che il gruppo RES presenti maggior BCP, ma minore produzione di ammoniaca del gruppo AL sta ad indicare che nel primo si assiste ad una migliore sincronia delle fermentazioni glucidiche e proteiche e una minore quota di ammoniaca resta inutilizzata nel contenuto ciecale (Bovera et al., 2012). Per quanto riguarda la percentuale di mortalità, la riduzione significativa ottenuta dal gruppo RES, potrebbe essere correlata ad un miglioramento dell'ambiente del sistema gastro-intestinale. Come è noto, il tasso di mortalità è un indicatore che viene preso in considerazione nella valutazione del benessere degli allevamenti cunicoli (Verga, 2000). I nostri risultati non ci permettono di trarre conclusioni definitive sul benessere dei conigli coinvolti nella prova, ma in base al tasso di mortalità, sembra che nei conigli del gruppo RES le condizioni sanitarie siano state migliori rispetto a quelli del gruppo AL. D'altro canto, è vero che applicando la restrizione idrica (e quindi quella alimentare) non viene rispettato uno dei principi enunciati dalle cinque libertà e, per la precisione la prima "libertà dalla sete, dalla fame e dalla cattiva nutrizione", tuttavia si osserva un netto miglioramento per un'altra delle libertà, la terza "libertà dal dolore, dalle ferite, dalle malattie".

La maggior parte delle caratteristiche della carcassa non sono state influenzate dalla tecnica di alimentazione adottata. In generale, si ritiene che la restrizione alimentare determini modifiche nell'accrescimento degli organi interni come il fegato e l'apparato digerente. In particolare, è stato

osservato che lo sviluppo dell'apparato digerente è compromesso dalla restrizione alimentare (Perrier e Ouhayoun, 1996) e che, dopo il periodo di restrizione, la crescita degli organi digestivi è rapida (Gidenne et al., 2011) anche se non tanto da riuscire, in tempi brevi, a permettere agli animali di aumentare rapidamente l'ingestione di alimento. Gidenne et al. (2012) hanno riportato un peso finale del tratto digerente (organi + contenuto) degli animali sottoposti a restrizione alimentare, di circa il 10% in più rispetto agli animali alimentati a volontà. Tuttavia, questo sviluppo maggiore del tratto digerente dipende dalla tecnica di restrizione alimentare adottata: Jerome et al. (1998) non trovarono differenze nell'incidenza percentuale del canale digerente dei conigli sottoposti ad una restrizione alimentare dell'80% fino a 49 giorni di età rispetto a quelli alimentati ad libitum (17,9 vs 18,9%, rispettivamente). Bergaoui et al. (2008) non trovarono differenze significative nella percentuale del canale digerente tra conigli alimentati ad libitum e conigli sottoposti a restrizione alimentare dell'85% da 42 a 77 giorni di età (20,1 vs 21,1%), mentre sono state osservate differenze significative per i conigli sottoposti ad una restrizione alimentare del 70% nel corso lo stesso periodo. Probabilmente, un livello moderato di restrizione alimentare ha influenza sullo sviluppo del tratto digestivo. Il maggiore sviluppo del tratto digerente nei conigli sottoposti a restrizione alimentare è legato anche a cambiamenti nel comportamento alimentare dei conigli, che, a differenza di quanto accade con l'alimentazione a volontà, effettuano un numero di pasti inferiore e, di conseguenza, una maggiore quantità di alimento viene ingerita per pasto determinando un effetto fisico di dilatazione del canale digerente stesso (Gidenne et al., 2011). Anche la tecnica usata per applicare la restrizione alimentare è molto importante. Gidenne et al. (2011) hanno riportato che quando la restrizione è applicata direttamente sull'alimento (riduzione della quantità totale o riduzione del tempo di accesso alla mangiatoia), il coniglio si adatta velocemente, con un consumo di alimento molto elevato subito dopo la somministrazione (raggiungendo anche il 40% della quantità giornaliera di alimento ingerito entro due ore dal primo accesso all'alimento) in soli 8 giorni dopo l'introduzione della restrizione alimentare. Quando i conigli sono alimentati a volontà il comportamento alimentare si caratterizza per la presenza di numerosi pasti, con un massimo del 10% della assunzione giornaliera 2-4 ore dopo che le luci sono state spente e una minima assunzione 2-4 h dopo che sono state accese, che probabilmente corrispondono al periodo di ciecotrofia (Gidenne et al. 2011). Nel nostro studio l'ingestione di alimento è stata ridotta limitando l'accesso all'acqua e in questo modo la capacità di adattamento dei conigli è stata meno rapida. Infatti, come riportato da Ben Rayana et al. (2008), quando l'acqua viene fornita per 2 ore al giorno, l'assunzione di alimento dei conigli ha raggiunto il 40% del totale, 4 ore dopo l'accesso all'acqua.

Elmaghraby (2011), applicando una restrizione idrica di 2 o 1 ora al giorno, non ha trovato differenze significative nell'incidenza del tratto gastrointestinale dei conigli nel confronto con quelli abbeverati ad libitum.

Alcuni autori (Bovera et al., 2008) hanno osservato minore incidenza percentuale dei grassi perirenale e scapolare in gruppi di conigli sottoposti a restrizione alimentare rispetto a quelli alimentati a volontà. Tuttavia, non è noto se anche restrizioni alimentari moderate possano avere un effetto sul tasso lipogenico. La riduzione del grasso perirenale e scapolare è di grande interesse in considerazione del fatto che il grasso perirenale è correlato con il grasso totale della carcassa (Ouhayoun et al., 1984).

Nei conigli, gli acidi grassi endogeni (sintetizzati dai carboidrati) sono principalmente C16:0, C18:1 e C18:0 (Ouhayoun et al., 1998.). Gli acidi grassi polinsaturi nelle carni di coniglio provengono principalmente dall'ingestione di lipidi esogeni (Ouhayoun, 1998), anche se la sintesi di n-3 PUFA è possibile, a partire dal suo precursore della dieta, nel fegato, e la quantità prodotta dipende dal rapporto n-6/n-3 della dieta (Peiretti e Meineri, 2008).

Tuttavia, secondo Castellini et al. (2002), la composizione in acidi grassi dei tessuti animali può essere modificata per effetto dell'azione della microflora gastro-intestinale, perché i microrganismi sono in grado di idrogenare gli acidi grassi insaturi in polinsaturi, o anche desaturare alcuni acidi organici. Castellini et al. (2002) hanno sottolineato il ruolo della microflora ciecale, mostrando che l'ingestione di feci molli ad opera dei conigli ha indotto una maggiore concentrazione di n-3 PUFA a catena lunga nella carne.

Nella nostra prova, il motivo principale delle differenze tra i profili acidici della carne è che le concentrazioni di SFA (principalmente, C16:0) e di n-3 PUFA (principalmente C20:5 e C22:5) sono aumentate quando è stata applicata la restrizione idrica. Quindi, è possibile che siano intervenute variazioni nella microflora ciecale (come avvalorato anche dalle variazioni di digeribilità della cellulosa e dalla differenza delle fermentazioni ciecali) favorendo microrganismi con preferenze per la sintesi di diversi acidi grassi, cosa che ha potuto modificare la composizione acidica della carne. Di conseguenza, la carne proveniente da conigli sottoposti a restrizione idrica sembra presentare maggiori caratteristiche di salubrità per il consumatore, a causa di superiori contenuti di n-3 e maggiore rapporto tra n-3/n-6. Tuttavia, la carne di conigli con libero accesso all'acqua di bevanda ha presentato indici aterogenico e trombogenico più favorevoli a causa del minor contenuto di C16:0. Da questo punto di vista, la carne dei conigli del gruppo RES è apparsa meno "sana" di quella del gruppo AL: alcune prove epidemiologiche e sperimentali indicano che una dieta ad alto contenuto di SFA (C12:0, C14:0 e C16:0) è associata ad alti livelli di colesterolo nel siero, che a loro volta sono collegati ad un'alta incidenza di malattie coronariche.

7.CONCLUSIONI

Limitare l'accesso all'acqua di bevanda nel periodo post-svezzamento può comportare vantaggi per la salute dell'apparato digerente del coniglio in accrescimento, riducendo il tasso di mortalità. Il miglioramento dell'ICA dopo il periodo di restrizione idrica può essere associato ad una migliore digeribilità della fibra, in particolare della cellulosa. A dispetto di un maggiore peso finale dei conigli che hanno ricevuto acqua ad libitum, la restrizione idrica non ha avuto effetti negativi sulle caratteristiche della carcassa, probabilmente a causa del progressivo aumento del tempo di distribuzione dell'acqua nel corso delle settimane, e le carcasse dei conigli sottoposti a restrizione idrica hanno presentato un contenuto inferiore di grasso perirenale e scapolare. Le caratteristiche fisiche e chimiche della carne sembrano non essere state influenzate dalla restrizione idrica, anche se la composizione in acidi grassi fornisce risultati contraddittori: infatti la carne di conigli "ristretti" ha presentato livelli più elevati di acido palmitico, ma anche più elevati contenuti di acidi grassi della serie omega-3 e un rapporto n3/n6 più favorevole. Quindi, a nostro avviso, la restrizione idrica può essere efficacemente utilizzata per migliorare lo stato sanitario dell'apparato digerente dei conigli giovani senza effetti negativi sul benessere degli animali, in particolare se applicato durante i mesi invernali.

8.BIBLIOGRAFIA

AOAC. 1984. Official Methods of Analysis. 14th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, DC.

AOAC. 2004. Official Methods of Analysis. 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.

Ben Rayana, A., Ben Amouda, M., Bergaoui, R., 2008. Effect of water restriction times of 2 and 4 hours per day on performances of growing rabbits. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp 541-545.

Bergaoui, R., Kammoun, M., Ouerdiane, K., 2008. Effects of feed restriction on the performance and carcass of growing rabbits. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 547-550.

Blasco, A., and J. Ouhayoun. 1996. Harmonization of criteria and terminology in rabbit meat research. Revised proposal. World Rabbit Sci. 4:93–99.

Boisot P, Duperray J, Dugenetais X and Guyonvarch A 2004. Interest of hydric restriction times of 2 and 3 h per day to induce feed restriction in growing rabbits. In Proceedings of the 8th World Rabbit Congress (ed. C Becerril and A Pro), pp. 759–764. Colegio de Postgraduados for WRSA, Puebla, Mexico. <http://world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/Congress-2004-Puebla/Puebla-2004-a.htm>

Bovera F., Lestingi A., Iannaccone F., Tateo A. and Nizza A. 2012. Use of dietary mannanoligosaccharides during rabbit fattening period: Effects on growth performance, feed nutrient digestibility, carcass traits, and meat quality. J ANIM SCI, in press: doi:10.2527/jas.2011-4119

Bovera, F., Piccolo, G., D’Urso, S., Nizza, S., Cutrignelli, M.I., 2008. Feed restriction during summer: effect on rabbit carcass traits and meat quality. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, pp. 1325-1330.

Bovera, F., S. Marono, C. Di Meo, G. Piccolo, F. Iannaccone, and A. Nizza. 2010. Effect of mannanoligosaccharides supplementation on caecal microbial activity of rabbits. Animal 9:1522–1527.

Castellini, C., A. Dal Bosco, and C. Mugnai. 2002. Effect of caecotrophy on the fatty acid profile of rabbit meat. *Prog. Nutr.* 4:125–130.

Christie WW, Sebedio JL, Juanéda P (2001). A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid. *Inform* 12: 147-152

Di Meo, C., Bovera, F., Marono, S., Vella, N., Nizza, A., 2007. Effect of feed restriction on performance and feed digestibility in rabbits. *It. J Anim. Sci.* 6(1):765-767.

El Maghraby MMA 2011. Effect of restricted access to drinking water on growth, feed efficiency and carcass characteristics of fattening rabbits. *Asian Journal of Animal Sciences* 5, 136–144.

Eseceli H., Demir E., Degirmencioglu N. and Bilgic M. 2010. The Effects of Bio-Mos® Mannan Oligosaccharide and Antibiotic Growth Promoter Performance of Broilers. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9: 392-395.

Folch, J., M. Lees, and H. Sloane-Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497–502.

Gidenne T, Garcia J, Lebas F and Licois D 2010. Nutrition and feeding strategy: interactions with pathology. In *Nutrition of the rabbit* (ed. C De Blas and J Wiseman), pp. 179–199. CABI, UK.

Gidenne T., Combes S., Fortun-Lamothe L. 2012. Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: a review. *Animal*, in press: doi:10.1017/S1751731112000389

Gidenne T., Fortun-Lamothe L., Combes S. 2011. Feed restriction strategies, implications on physiology, growth and health of the growing rabbit. *Proceeding of Giornate di Coniglicoltura ASIC, Forlì, Italy, April 8 – 9: 1-19.* http://www.asic-wrsa.it/documenti/giornate2011/lavori/L01_Gidenne.pdf

Gondret, F., Lebas, F., Bonneau, M., 2000. Restricted feed intake during fattening reduces intramuscular lipid deposition without modifying muscle fiber characteristics in rabbits. *J. Nutr.* 130:228-233.

Jerome, N., Mousset, J.L., Messenger, B., Deglaire, I., Marie, P., 1998. Influence de différentes méthodes de rationnement sur les performances de croissance et d'abattage du lapin. In : Proc. 7èmes Journ. Rech. Cunicole Fr., Lyon, France, pp. 175-178.

Martignon, M.H., 2010. Consequences of a feed intake control on digestive physiopathology and on feeding behaviour . PhD thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse, p. 194.

Mourao, J. L., V. Pinheiro, A. Alves, C. M. Guedes, L. Pinto, M. J. Saavedra, P. Spring, and A. Kocher. 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. 1998. Influence of the diet on rabbit meat quality. Pages 177–195 in *The nutrition of the rabbit*. C. De Blas, and J. Wiseman, ed. CAB International, Wallingford, UK.

Ouhayoun, J., D. Delmas, G. Monin, and P. Roubiscoul. 1990. Abbatage du lapin. II. Effect du mode de refrigeration sur la biochimie et la contraction des muscles. Page 45 in Proc. 5èmes Journées de la Recherche Cunicoles, Paris. ITAVI, ed. Paris, France.

Ouhayoun, J., T. Gidenne, and Y. Demarne. 1984. Evolution postnatale de la composition en acides gras des lipids du tissue musculaire chez le lapin en regime hypolipidique. *Reprod. Nutr. Dev.* 25:505–509.

Peiretti, P. G., and G. Meineri. 2008. Effects on growth performance, carcass characteristics, and the fat and meat fatty acid profile of rabbits fed diets with chia (*Salvia hispanica* L.) seed supplements. *Meat Sci.* 80:1116–1121.

Perrier, G., Ouhayoun, J., 1996. Growth and carcass traits of the rabbit a comparative study of three modes of feed rationing during fattening. In: Proc. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, France, 3:225-232.

Piccolo, G., F. Bovera, C. Di Meo, N. Vella, M. I. Cutrignelli, and A. Nizza. 2009. Mannan oligosaccharides as growth promoter in finishing rabbit: effect on in vivo performance and carcass traits. *Ital. J. Anim. Sci.* 8:796–798.

Roe, M. T., and S. D. Pillai. 2003. Monitoring and identifying antibiotic resistance in bacteria. *Poult. Sci.* 82:622–626.

SAS. 2000. SAS/STAT users guide: statistics. SAS Inst. Inc., Cary, NC.

Tumova E., Skrivanova V., Zita L., Skrivan M., Fuckova A. 2004. The effect of restriction on digestibility of nutrients, organ growth and blood picture in broiler rabbits. 8th World Rabbit Congress. 4: 1008-1014. On-line. Internet. 14 March 2007. <http://www.dcam.upv.es/8wrc/>

Ulbricht, T. L., and D. A. T. Southgate. 1991. Coronary heart disease: Seven dietary factors. *The Lancet* 338:985–992.

Verga M. 2000. Intensive rabbit breeding and welfare: development of research, trends and applications. In *Proc.: 7th World Rabbit Congress, Valencia, Spain*, 491-509.

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

Xiccato, G. 1989. Quale sistema energetico per il coniglio. *Prof. Allev.* 2:1–8.

9. CONCLUSIONI GENERALI

Alla luce dei lavori condotti ed esaminando i risultati ottenuti, si può affermare che le alternative da noi adottate in sostituzione agli antibiotici per migliorare le performance produttive e la qualità della carne, hanno influenzato positivamente le produzioni.

Nei primi due lavori si è visto come i mannanoligosaccaridi sono capaci di migliorare le fermentazioni della parete cellulare, con particolare riferimento alla cellulosa, garantendo anche un buon sincronismo delle fermentazioni ciecali e, di conseguenza, riducendo il contenuto di ammoniaca nel cieco. Inoltre, livelli crescenti di MOS nella dieta (0.5-1-1.5g/kg di dieta) implementano gli indici di conversione alimentare nella fase di finissaggio. Per quanto riguarda la qualità della carne, i MOS possono migliorare quest'ultima, modificando il profilo degli acidi grassi, con una riduzione di quelli saturi, un aumento dei monoinsaturi e una riduzione dell'indice trombotico, senza effetti negativi sulle caratteristiche chimiche e fisiche delle carni.

Nel terzo lavoro la somministrazione di *Lactobacillus plantarum* mediante spray, durante il periodo di allattamento, non ha migliorato le performance di accrescimento, ma ha ridotto il tasso di mortalità, potenziando il sistema immunitario e quindi migliorando lo stato sanitario dell'apparato digerente degli animali a causa di un possibile cambiamento nella flora batterica (presenza di *L. Plantarum* nel contenuto ciecale).

Infine nell'ultimo lavoro, il limitare l'accesso all'acqua per ridurre l'assunzione di alimento ha riportato effetti positivi, infatti ha ridotto la mortalità e ha migliorato l'ICA. Questo, probabilmente, è stato causato da una maggiore digeribilità della fibra, in particolare della cellulosa. La restrizione idrica, non ha però avuto effetti negativi sulle caratteristiche della carcassa, e inoltre quest'ultima ha presentato un contenuto inferiore di grasso perirenale e scapolare.

A mio avviso, però, bisogna tener presente i costi di produzione e quindi il rapporto tra costi-benefici apportati da queste tecniche alternative, che in un contesto zootecnico fanno sì che le molecole prese in esame possano essere utilizzate o meno.

Infatti l'inclusione di MOS, come di lattobacilli, è sì vantaggiosa, ma bisogna giustificarla da un punto di vista di produttività aziendale. Tenendo conto di questa considerazione, la restrizione idrica, per controllare l'assunzione di alimento, ha il doppio vantaggio di apportare benefici riducendo i costi di produzione, senza comportare una voce aggiuntiva alle spese del bilancio aziendale.

In conclusione, considerando che la produzione di carne di coniglio è un settore molto delicato, per le problematiche sopra descritte, bisognerebbe lavorare sull'igiene aziendale ed effettuare periodicamente la prassi del vuoto sanitario, cosa non sempre fatta dagli allevatori e non sempre

possibile quando si hanno dei riproduttori di alto valore genetico in azienda. A questi accorgimenti “igienici”, considerando il divieto di utilizzo di antibiotici a scopo auxinico e profilattico in produzione animale, l’utilizzo combinato di probiotici, prebiotici e restrizione alimentare potrebbe essere una soluzione vantaggiosa per il settore.