FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
BRESCIA

ATTI DELLE GIORNATE DI CONIGLICOLTURA ASIC 2011

Forlì, 8-9 aprile 2011 - Salone internazionale avicolo e cunicolo - edizione 2011

A cura di Massimiliano Petracci, Simone Rimini e Claudio Cavani

FIERAVICOLA

88

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

ATTI DELLE GIORNATE
DI CONIGLICOLTURA ASIC 2011

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1 - 1979 Infezioni respiratorie del bovino
2 - 1980 L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria
3 - 1980 Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria
4 - 1980 Gli antibiotici nella pratica veterinaria
5 - 1981 La leucosi bovina enzootica
6 - 1981 La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia
7 - 1982 Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale
8 - 1982 Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino
9 - 1983 Zoonosi ed animali da compagnia
10 - 1983 Le infezioni da Escherichia coli degli animali
11 - 1983 Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria
12 - 1984 5° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
13 - 1984 Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo
14 - 1984 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione
15 - 1985 La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino
16 - 1986 Immunologia comparata della malattia neoplastica
17 - 1986 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
18 - 1987 Embryo transfer oggi: problemi biologici e tecnici aperti e prospettive
19 - 1987 Coniglicoltura: tecniche di gestione, ecopatologia e *marketing*
20 - 1988 Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986
21 - 1989 Le infezioni erpetiche del bovino e del suino
22 - 1989 Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie
23 - 1989 La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa
24 - 1989 Chick Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili
25 - 1990 Mappaggio del genoma bovino
26 - 1990 Riproduzione nella specie suina
27 - 1990 La nube di Chernobyl sul territorio bresciano
28 - 1991 Le immunodeficienze da retrovirus e le encefalopatie spongiformi
29 - 1991 La sindrome chetosica nel bovino
30 - 1991 Atti del convegno annuale del gruppo di lavoro delle regioni alpine per la profilassi delle mastiti
31 - 1991 Allevamento delle piccole specie
32 - 1992 Gestione e protezione del patrimonio faunistico
33 - 1992 Allevamento e malattie del visone
34 - 1993 Atti del XIX Meeting annuale della S.I.P.A.S., e del Convegno su Malattie dismetaboliche del suino
35 - 1993 Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche - Atti 1a conferenza nazionale
36 - 1993 Argomenti di patologia veterinaria
37 - 1994 Stato dell'arte delle ricerche italiane sul settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche
38 - 1995 Atti del XIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
39 - 1995 Quale bioetica in campo animale? Le frontiere dell'ingegneria genetica
40 - 1996 Principi e metodi di tossicologia in vitro
41 - 1996 Diagnostica istologica dei tumori degli animali
42 - 1998 Umanesimo ed animalismo
43 - 1998 Atti del Convegno scientifico sulle enteropatie del coniglio
44 - 1998 Lezioni di citologia diagnostica veterinaria
45 - 2000 Metodi di analisi microbiologica degli alimenti
46 - 2000 Animali, terapia dell'anima
47 - 2001 Quarantacinquesimo della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2000

48 - 2001 Atti III Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
49 - 2001 Tipizzare le salmonelle
50 - 2002 Atti della giornata di studio in cardiologia veterinaria
51 - 2002 La valutazione del benessere nella specie bovina
52 - 2003 La ipofertilità della bovina da latte
53 - 2003 Il benessere dei suini e delle bovine da latte: punti critici e valutazione in allevamento
54 - 2003 Proceedings of the 37th international congress of the ISAE
55 - 2004 Riproduzione e benessere in coniglicoltura: recenti acquisizioni scientifiche e trasferibilità in campo
56 - 2004 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia suina
57 - 2004 Atti del XXVII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
58 - 2005 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli
59 - 2005 IV Congresso Italiano di Storia della Medicina Veterinaria
60 - 2005 Atti del XXVIII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
61 - 2006 Atlante di patologia cardiovascolare degli animali da reddito
62 - 2006 50° Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2005
63 - 2006 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia del coniglio
64 - 2006 Atti del XXIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
65 - 2006 Proceedings of the 2nd International Equitation Science Symposium
66 - 2007 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli - II edizione
67 - 2007 Il benessere degli animali da reddito: quale e come valutarlo
68 - 2007 Proceedings of the 6th International Veterinary Behaviour Meeting
69 - 2007 Atti del XXX corso in patologia suina
70 - 2007 Microbi e alimenti
71 - 2008 V Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
72 - 2008 Proceedings of the 9th world rabbit congress
73 - 2008 Atti Corso Introduttivo alla Medicina non Convenzionale Veterinaria
74 - 2009 La biosicurezza in veterinaria
75 - 2009 Atlante di patologia suina I
76 - 2009 Escherichia Coli
77 - 2010 Attività di mediazione con l'asino
78 - 2010 Allevamento animale e riflessi ambientali
79 - 2010 Atlante di patologia suina II Prima Parte
80 - 2010 Atlante di patologia suina II Seconda Parte
81 - 2011 Esercitazioni di microbiologia
82 - 2011 Latte di asina
83 - 2011 Animali d'affezione
84 - 2011 La salvaguardia della biodiversità zootecnica
85 - 2011 Atti I Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
86 - 2011 Atti II Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
87 - 2011 Atlante di patologia suina III

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
BRESCIA - ITALY

FIERAVICOLA

ATTI DELLE GIORNATE DI CONIGLICOLTURA ASIC 2011

8-9 aprile 2011
Salone internazionale avicolo e cunicolo - edizione 2011
Forlì, Italy

A cura di:
Massimiliano Petracci, Simone Rimini, Claudio Cavani

In collaborazione con

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA
Via A. Bianchi, 1 - 25124 Brescia

ISBN 978-88-97562-02-3

© Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, gennaio 2012

Tipografia Camuna - Brescia 2012

Sponsors

ELANCO

Martini

VERONESI

Ceva

PROGEO
MANGIMI

HUVEPHARMA
Add performance to your business

iZO

PRESENTAZIONE

La Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia ha accolto con piacere la richiesta di pubblicare gli "Atti delle giornate di coniglicoltura ASIC 2011" Forlì 8-9 aprile 2011.

Gli Atti, entrando a far parte della Collana editoriale della Fondazione, mettono a disposizione dei cultori della materia le più recenti informazioni tecniche e scientifiche della coniglicoltura.

Il Segretario Generale
Dr. STEFANO CAPRETTI

GIORNATE DI CONIGLICOLTURA ASIC 2011

Associazione Scientifica Italiana di Coniglicoltura
Fiera di Forlì, 8-9 aprile 2011

Enti organizzatori

Associazione Scientifica Italiana di Coniglicoltura (ASIC) - Fiera di Forlì - Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia

Comitato organizzatore

Claudio Cavani *(Presidente) (Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna)* - Luca Bano *(Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Sez. di Treviso)* - Antonio Camarda *(Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università di Bari)* - Alessandro Dal Bosco *(Dipartimento di Biologia Vegetale e Biotecnologie Agroalimentari e Zootecniche. Sez. di Scienze Zootecniche, Università di Perugia)* - Andrea Frabetti *(Gruppo Martini spa)* - Mario Giovannoli *(ANCI-AIA)* - Massimiliano Petracci *(Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna)* - Ivan Toschi *(Dipartimento di Scienze Animali, Sez. di Zootecnica Veterinaria, Università di Milano)* - Angela Trocino *(Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova)* - Andrea Zuffellato *(Gruppo Veronesi spa)*

Comitato scientifico

Antonio Camarda *(Presidente) (Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università di Bari)* - Fabrizio Agnoletti *(Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Sez. di Treviso)* - Cristiano Boiti *(Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie, Università di Perugia)* - Claudio Cavani *(Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna)* - Guido Grilli *(Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università di Milano)* - Antonio Lavazza *(Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia)* - Fabio Luzi *(Dipartimento di Scienze Animali, Sez. di Zootecnica Veterinaria, Università di Milano)* - Antonino Nizza *(Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti, Università di Napoli)* - Gerolamo Xiccato *(Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova)*

Segreteria scientifica *(Scientific secretary)*

Massimiliano Petracci, Simone Rimini *(Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna)* - Tel. +39 0547 338128 - Fax +39 0547 382348 - Email: giornateasic.disa@unibo.it

PRESENTAZIONE DELLE GIORNATE DI CONIGLICOLTURA ASIC 2011

Cari amici e Soci ASIC

abbiamo il piacere di darVi il benvenuto alla quarta edizione delle Giornate di Coniglicoltura ASIC, tenuta ancora una volta qui a Forlì, nei giorni 8-9 aprile 2011 in concomitanza con la 47ª Fiera Internazionale Avicola e Cunicola. Il buon successo delle precedenti edizioni ci incoraggia a continuare lo sforzo per raccogliere e condividere le più recenti informazioni tecniche e scientifiche della coniglicoltura e per promuovere questo convegno a livello internazionale.

Questo evento è stato organizzato in collaborazione con l'ASIC e la Fiera di Forlì e con il patrocinio dell'Associazione Scientifica Italiana di Produzione Animale (ASPA), la Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche (Brescia), il Dipartimento di Scienze Animali dell'Università di Padova e il Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università di Bologna. Tutti i membri del Comitato Organizzatore e del Comitato Scientifico hanno condiviso il progetto e l'organizzazione del convegno. Un ringraziamento speciale va alla Fiera di Forlì che ha messo a disposizione i locali e ha offerto un contributo finanziario per coprire i costi della traduzione e le spese dei relatori stranieri invitati. Inoltre siamo grati a tutti i partecipanti e alle industrie che hanno sponsorizzato l'evento e altre attività della nostra Associazione. Infine, ringraziamo tutti gli autori che hanno preparato e inviato i loro contributi scientifici. La partecipazione di ricercatori stranieri e di rappresentanti delle industrie provenienti da Francia, Spagna, Ungheria, Belgio e Svizzera è particolarmente apprezzata.

Le Giornate di Coniglicoltura ASIC 2011 si svolgeranno in due giorni. Il primo sarà dedicato a tre relazioni ad invito focalizzate su argomenti di grande attualità per la coniglicoltura: Strategie di razionamento alimentare e riflessi sulla crescita, lo stato fisiologico e la salute del coniglio (Thierry Gidenne, INRA, Francia); Induzione dell'ovulazione nelle coniglie fattrici (Alessandro Dal Bosco, Università di Perugia); Fattori che influenzano l'efficacia della somministrazione intravaginale di GnRH analoghi per l'induzione dell'ovulazione nella coniglia (Pilar Rebollar, Università Politecnica di Madrid, Spagna). Il programma scientifico continuerà con le comunicazioni orali nell'area di "Riproduzione e Genetica". Durante il pomeriggio, verranno presentati lavori nelle sessioni di "Nutrizione e Fisiologia", "Benessere e Management" e "Patologia". I poster verranno presentati durante le pause.

Il secondo giorno sarà dedicato alla Tavola Rotonda "Gestione ed impiego dei farmaci e dei vaccini in coniglicoltura" con i seguenti interventi programmati: Monitoraggio delle farmacosensibilità in coniglicoltura (Luca Bano); Utilizzo del farmaco nell'allevamento cunicolo: problemi di farmacosorveglianza (Marcello Tordi); Utilizzo del farmaco nell'allevamento cunicolo: criticità ed esperienze di campo (Francesco Dorigo); Impiego dei vaccini nell'allevamento del coniglio: attualità e nuove problematiche (Antonio Lavazza) e Impegno del Ministero della Salute nel settore cunicolo (Gaetana Ferri).

Sia le relazioni ad invito che le comunicazioni scientifiche saranno immediatamente disponibili sul sito web dell'ASIC (http://www.asic-wrsa.it/) e saranno pubblicate in un numero speciale a cura della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche (Brescia) che verrà inviato quanto prima ai partecipanti registrati al Convegno.

Forlì, 8-9 aprile 2011

Prof. CLAUDIO CAVANI
Presidente Comitato Organizzatore

Prof. ANTONIO CAMARDA
Presidente ASIC

INDICE

RELAZIONI SU INVITO

Feed restriction strategies, implications on physiology, growth and health of the growing rabbit. *Gidenne T., Fortun-Lamothe L., Combes S.* 3

Induzione dell'ovulazione nella coniglia fattrice: il punto sullo stato della ricerca. *Dal Bosco A.* 25

Factors affecting efficacy of intravaginal administration of GnRH analogues for ovulation induction in rabbit does. *Rebollar P.G.* 41

LAVORI SCIENTIFICI

Sessione Riproduzione e Genetica

Utilizzo di una vagina artificiale digitale per il prelievo del seme di coniglio: risultati preliminari. *Cardinali R., Dal Bosco A., Moscati L., Castellini C.* 57

Analisi di geni candidati per il locus dilute che determina la diluzione del colore del mantello nel coniglio. *Fontanesi L., Scotti E., Colombo M., Dall'Olio S., Oulmouden A., Russo V.* 61

Effect of feeding program before weaning on the performance of rabbit does and their kits. *Gerencsér Zs., Matics Zs., Nagy I., Szendrő Zs.* 65

Effect of re-insemination interval after the first parturition on the performance of rabbit does. *Matics Zs., Kustos K., Gerencsér Zs., Radnai I., Nagy I., Szendrő Zs.* 69

CT-based selection for improving the carcass traits of growing rabbits. *Szendrő Zs., Matics Zs., Gerencsér Zs., Radnai I., Nagy I.* 73

Effetto della somministrazione di licopene sulla qualità del seme di coniglio: risultati preliminari. *Toschi I., Mangiagalli M.G., Cesari V., Luzi F., Cerolini S., Marelli S.* 77

Sessione Nutrizione e Fisiologia

Effetto dei mannanoligasaccaridi sulle performance di accrescimento del coniglio. *Bovera F., Iannaccone F., Di Meo C., Piccolo G., Nizza A.* 83

Effect of sugar beet pulp fibre fractions on growth performance, fecal digestibility and digestive physiology in rabbits around weaning. *El Abed N., Delgado R., Abad R., Romero C., Fernandez A., Villamide M.J., Menoyo D., García J., Carabaño R.* 87

Influenza del tenore proteico della dieta sul livello ematico di urea, sul pH uterino e sull'efficienza riproduttiva di coniglie in lattazione. *Marongiu M.L., Gulinati A.* 91

Prove di integrazione con acqua ozonizzata e con estratti vegetali nel coniglio in accrescimento. *Masoero G., Barge P., Chicco R., Solomita M., Zoccarato I.* 95

Influenza della somministrazione di diete ipoproteiche in conigli in accrescimento. *Masoero G., Chicco R., Solomita M.* 99

Diete per fattrici acidificate o integrate con Probiotan®. *Masoero G., Meineri G., Barge P., Malavasi C., Chicco R., Solomita M.* 103

Dieta ipoproteica per coniglie allattanti e relazioni fra creatinina e urea nelle urine. *Masoero G., Miniscalco B., Mattioda R., Chicco R., Solomita M.* 107

Integrazione con aminoacidi di sintesi in diete ipoproteiche: prove di crescita e bilancio azotato. *Masoero G., Miniscalco B., Mattioda R., Chicco R., Solomita M.* 111

Riduzione del livello proteico e aumento del rapporto fibra solubile/amido in diete per conigli in accrescimento. *Tazzoli M., Majolini D., Trocino A., Xiccato G.* 117

Sessione Benessere e Management

Monitoraggio dei parametri ambientali in allevamenti di conigli da carne ed analisi dell'influenza stagionale. *Bonci M., da Borso F., Mezzadri M., Teri F., Bano L., Drigo I., Mazzolini E., Agnoletti F.* 123

Studio quantitativo della contaminazione fungina dell'aria in diverse tipologie di allevamenti di conigli e proposta di un metodo di campionamento standardizzato. *Bonci M., Mazzolini E., Bano L., Drigo I., Agnoletti F.* 127

Effetto del tipo di gabbia su alcuni aspetti fisiologici, comportamentali e produttivi della coniglia fattrice. *Mugnai C., Cardinali R., Moscati L., Dal Bosco A., Castellini C.* 131

Prestazioni produttive e risultati di macellazione in conigli allevati in gabbia singola, bicellulare e in colonia. *Trocino A., Tazzoli M., Majolini D., Xiccato G.* 135

Sessione Patologia

Caratterizzazione molecolare e resistenza antimicrobica di *Salmonella* ser. Typhimurium da allevamenti cunicoli dell'Italia meridionale. *Camarda A., Pugliese N., Pupillo A., Circella E., Ricci M., Pazzani C.* 141

Myxomatosi del coniglio: il contributo del laboratorio diagnostico alla gestione e controllo della malattia sul territorio. *Capucci L., Cavadini P., Botti G., Brivio R., Grilli G., Lavazza A.* 145

Isolamento di *Arcanobacterium pyogenes* in un episodio di infertilità della coniglia. *Cocchi M., Ceglie L., Di Giusto T., Deotto S., Clapiz L., Genero N., Bregoli M., Lenarduzzi M.* 149

Presenza dei geni *icaA* e *icaD* e formazione del biofilm in ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati nel coniglio. *Cocchi M., Di Giusto T., Deotto S., Bacchin C., Clapiz L., Genero N., Di Sopra G., Bregoli M., Passera A., Drigo I.* 153

Studio della vancomicino resistenza in ceppi di *Enterococcus spp* isolati dal coniglio. Risultati preliminari. *Cocchi M., Genero N., Clapiz L., Deotto S., Di Sopra G., Bregoli M., Di Giusto T.* 157

Enterotossine stafilococciche in ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati in corso di mastite nella coniglia. *Cocchi M., Passera A., Deotto S., Clapiz L., Genero N., Bregoli M., Di GiustoT.* 161

Encefalitozoonosi del coniglio: approccio diagnostico e correlazione tra grading macro-microscopico, colorazione immunoistochimica e sierologia. *Gibelli L., Lavazza A., Tittarelli C., Rota Nodari S., Nassuato C., Gelmetti D.* 165

Encefalitozoonosi del coniglio in allevamenti della Lombardia: prevalenza sierologica e parametri di chimica clinica. *Lavazza A., Cerioli M., Archetti I.L., Tittarelli C., Brivio R., Nassuato C.* 169

Interesse economico della prevenzione della coccidiosi nel coniglio: studio di campo. *Vancraeynest D.* 173

Studio longitudinale sull'escrezione di coccidi in conigli di aziende industriali che applicano uno schema di trattamento anticoccidico bifasico. *Vereecken M., Chiari M., Tittarelli C., Bertinato F., Zuffellato A., Zanoni M., Schiavi P., De Gussem K., Lavazza A.* 177

Sessione Qualità della Carne

Impiego della marinatura per la valorizzazione delle carni di coniglio. *Petracci M., Rimini S., Biguzzi G., Cavani C.* 185

RELAZIONI SU INVITO

FEED RESTRICTION STRATEGIES, IMPLICATIONS ON PHYSIOLOGY, GROWTH AND HEALTH OF THE GROWING RABBIT

GIDENNE T.*, FORTUN-LAMOTHE L., COMBES S.

Thierry Gidenne, INRA Toulouse, UMR 1289 TANDEM; BP 52627, Castanet-Tolosan, France
Tel. +33 561285103 - Fax: +33 561285319
*Corresponding author: thierry.gidenne@toulouse.inra.fr

ABSTRACT

This review aims to present the different effects produced by a post-weaning intake limitation strategy on the growing rabbit. If a lower intake level leads to a lower growth, in return an improved feed conversion is obtained, particularly when the rabbits are again fed freely since a compensatory growth occurs. This better feed conversion originates from a better digestion associated to a longer rate of passage, whereas the digestive physiology is slightly modified (morphometry of the intestinal mucosa, fermentation pattern, symbiote). Meat quality and carcass characteristics are not greatly affected by restriction strategy, except a lower dressing out percentage. One of the main interests of limiting post-weaning intake of the rabbit is to reduce the mortality and morbidity rate due to digestive disorders (particularly ERE syndrome). In conclusion, restriction strategies are used by 95% of the French rabbit breeders, because these improve their economic balance. However, this benefit depends of the national market and feed prices, and should be adapted to any specific breeding situation.

Key words: Feed restriction, Digestive health, Growth, Feed conversion.

INTRODUCTION

For the young mammal, the weaning and the post weaning period are particularly important for the growth performances and feed efficiency, including the resistance to digestive pathologies, that are frequent either for the piglet, calve, or for the young rabbit between 5 and 10 weeks of age. For instance, in the rabbit, infectious digestive disorders account for a high incidence during the fattening period (Marlier *et al*., 2003). They may have a multi-factorial origin, with a combination of one or several pathogenic agents (bacteria, coccidia, etc.). Moreover, the European ban on antibiotic growth promoters in animal feeds has even complicated the weaning management. The situation of the young rabbit was most critical, since the first outbreaks in 1997 of the Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE) led to high morbidity and mortality rate (up to 70%). Although, preventive medication with antibiotics (given under veterinarian prescription) helps to control the ERE or other previous digestive disease (e.g. enteropathogenic col-

ibacillosis "EPEC") there is an urgent need to find alternative solutions to control the disease, with a reduced used of drugs. Among some solutions, such the improvement of hygiene, the breeding in batch, improvement in the nutritional and feeding strategies has been proposed, for the growing rabbit, in the past ten years.
For instance, new recommendations for fibre requirements and recent reviews were recently published that outlined the minimal needs of the growing rabbit for different fibre fractions to reduce the risk of digestive troubles, either from ERE or EPEC or on specific digestive troubles (De Blas *et al*., 1999, Gidenne, 2003; Carabaño *et al*., 2008; Gidenne *et al*., 2010).
Besides, the control of the feed intake in the young rabbit was subjected to some past studies to analyse the effects on the carcass quality of the rabbit, or its digestive efficiency. But since 2003, several authors deal with the relationship between post-weaning intake level and digestive trouble incidence for the growing rabbit, including either studies with experimental infections (either ERE or EPEC), or large-scale studies in the French network of rabbit experimental units (GEC group).
Presently, strategies of intake limitation after weaning are now largely widespread in French rabbit breeders (95% of the professional breeders), in parallel to the development of new automatic feeding equipments, since positive impact have been obtained on resistance to digestive troubles and on feed efficiency.
Various short-term post-weaning restriction strategies have been studied in the rabbit, according to the duration of the restriction period (1 to 5 weeks), or to the intensity of the intake limitation (90 to 40% of the voluntary intake), or to the method (quantitative feed restriction, water restriction, limited time access to the feeder, etc..). Thus, the present review aims to summarise the results obtained during the past ten years, on digestive functions, health, growth and carcass characteristics, but also on feeding behaviour and welfare, in the growing rabbit submitted to different intake limitation strategies, without changes in feed quality.

FEED INTAKE CONTROL: VARIOUS TECHNIQUES FOR VARIOUS AIMS

Before or after weaning, the young rabbit usually has a free access to the feed and water (*ad libitum*, AL). Various techniques have been studied to control the feed (or water) intake, for two main aims: the control of the carcass and meat quality (Perrier and Ouhayoun, 1996) and the improvement of the feed efficiency to reduce the feed costs. Two main classes of restriction techniques are used: a quantitative intake limitation, and a "qualitative" restriction. For the latter, modification of nutrient intake is reached through a modification of the feed composition. For example, energy intake is frequently reduced by using high-fibre diets for young reproducing female. But here, we will detail "quantitative" intake limitation without any change in the diet composition. A "quantitative" restriction can be applied according to two methods: the time for access to the feeder or the quantity of feed distributed can be reduced (Feugier, 2002; Szendrő *et al*., 2000). In addition, this can be applied for different time periods (e.g. feed restriction applied directly after weaning and ad libitum in the fattening period or vice-versa). For instance, in some periods of the production cycle, namely, during the growing period.

First studies dealing with feed restriction observed *a posteriori* the level of intake, by limiting the access to the water (Lebas and Delaveau, 1975), when rabbits are fed a dry feed, such pelleted feeds. Since, a daily distribution of a ration is time consuming when automatic feedings are not available, and because the feed consumption is directly correlated with the water consumption (Gidenne and Lebas, 2005), hydric restriction has been studied (and used by some French rabbitries) recently to evaluate the impact on digestive health. For instance, the feed intake was reduced by 18% when the access to water was reduced to 2 hours, (Boisot *et al*., 2004), by 22% for 1h30min water access (Verdelhan *et al*., 2004) and by 23% for 1 hour access to water (Boisot *et al*., 2005). But, such a severe hydric restriction is questionable in terms of animal welfare, particularly for hot climatic conditions (Foubert *et al*., 2007; Ben Rayana *et al*., 2008), and the results obtained seems less precise compared to feed restriction in terms of performances and health.

Another easy way to restrict the intake is a time limited access to the feeder, within a day, or among a week. For the latter, it is possible to reach a 80% intake by distributing the feed 5 days a week (no feed during the week end) (Lebas and Laplace, 1982). The same intake level (80% of AL) is obtained with a 8-hour access to the feeder (Szendrő *et al*., 1988; Jerome *et al*., 1998). But, the distribution procedure seems to give different effects on the digestive organs development: for example, the liver weight was higher in rabbits submitted to an intermittent restriction (5 days out 7) compared to those continuously restricted with a ration given daily. In addition, for the same restriction level (70% intake) the digestive tract development vary according to the technique used: the full digestive tract at 67 d of age was 12% heavier (compared to AL) when the feed was given 5 days a week, and 28% heavier when given daily (Lebas and Laplace, 1982). As reported by Jerome *et al*. (1998), giving the feed only during the day (8:00 to 18:00) reduced the feed intake by 20% (121 *vs.* 151 g/d for AL), while a feed access during the night only reduced the intake by 10% and growth by only 5% (*vs.* 12% for day feeding). Feed conversion was improved only for the day-feeding (2.67 *vs.* 2.93 for AL).

Besides, since the feeding behaviour of the growing rabbit corresponds to numerous meals (30 to 40 per day, Prud'hon *et al*., 1975), it is not possible to limit the intake of the growing rabbit only by reducing the access to the pellets, e.g. by reducing the width of the feeder. In fact, to reach a correct control of the post-weaning intake, the more precise techniques is to give every day a defined quantity of pelleted feed, either manually (such as in experiments) or using automatic feeding equipments (now widespread in French rabbit farms). However, this quantity could be given in one time, or fractionated in several meals. Recent studies showed that giving a ration in 2 meals or even in 13 meals (to simulate the natural feeding behaviour) did not modify the health status, digestion, growth or feed conversion (Gidenne *et al*., 2009b,c; Martignon *et al*., 2009). Thus, the favourable effect of an intake limitation originates from the feed quantity itself and not from the feed distribution technique.

Furthermore, along the fattening period various restriction programs are possible: linear or not, step by step, continuous or alternate restriction periods, etc. The restriction program are thus adapted to the objectives of the farmers: health status improvement, feed costs reduction, reducing the pellets intake to favour the forage consumption (Yakubu *et al*., 2007), etc.

IMPACT OF A POST-WEANING FEED RESTRICTION ON GROWTH, FEED CONVERSION, ORGAN DEVELOPMENT AND CARCASS TRAITS

Weight gain and feed conversion according to the intake level

Obviously, an intake reduction leads to a growth reduction, during the period of intake restriction (Table 1). For instance, according to the results of Gidenne *et al*. (2009) obtained in 2002 on a multi-site study (6 sites and about 2000 rabbits per treatment), a linear reduction of the feed quantity offered to the rabbit, from weaning (35 d) and during three weeks, led to a proportional linear reduction of the growth: i.e. when the intake was reduced by 20% of AL (i.e. intake level=80% of "AL" *ad libitum*) the weight gain was proportionally reduced by 20%. However, this apparently "logic" proportional rule seems not to be generalised for the growing rabbit, since growth reduction obtained in several studies vary substantially, according to several factors, such the feed composition or the health status, etc.

Table 1 – Post weaning quantitative£ reduction of the feed intake and growth of the rabbit.

Intake level$	Restriction // *ad libitum* period	Weight gain, under restriction (R), g/d	Weight gain after restriction (AL), g/d	Whole weight gain	Weight at the end of restriction, g	Weight, end of trial, g	Reference
100		38.1a			2028a		Lebas and Laplace, 1982
70	R: 35-56d	25.2b			1768b		
100	R: 35*-56d	49.6a	42.0a	45.8a	2175a	3059a	
70	AL:	28.2b	54.6b	41.6b	1729b	2877b	Perrier, 1998
50	56-77d	15.3c	62.4c	39.0c	1460c	2772b	
100	R: 28*-49d	42.2a		41.5a	1583a	2443a	Jérome *et al*., 1998
80	AL: 63-70d	38.3b		37.4b	1505b	2268b	
100	R: 34*-58d	47.8a	38.3a	43.7a	1907a	2519a	Boisot *et al*., 2003
80	AL:	41.3b	42.5b	41.8b	1772b	2451b	
60	56-70d	32.3c	47.7c	38.7c	1573c	2337c	
100	R: 32*-53d	51.4a	38.6a	46.2a	1908a	2438a	Foubert *et al*., 2008a
70	AL: 53-67d	36.9b	46.5b	40.3b	1585b	2218b	
100	R: 42-77d	38.5a			2115a		Bergaoui *et al*., 2008
85		34.6b			1995b		
70		29.4c			1740c		
100	R:	40.7a	46.1a	43.5a	1799a	2468a	
80	35*-54d	32.3b	51.1b	40.8b	1624b	2373bc	Gidenne *et al*., 2009a
70	AL:	28.4c	54.6c	40.0b	1540c	2340c	
60	54-70d	23.0d	58.4d	38.2c	1431d	2279d	
100	R: 35*-63d	46.4a	39.9a	45.1a	2319a	2612a	Gidenne *et al*., 2009b
75	AL: 63-70d	38.9b	47.6b	40.6b	2112b	2454b	

Intake level$	Restriction // *ad libitum* period	Weight gain, under restriction (R), g/d	Weight gain after restriction (AL), g/d	Whole weight gain	Weight at the end of restriction, g	Weight, end of trial, g	Reference
100	R: 35*-63d	45.7a	49.2a	46.4a	2352a	2724a	Gidenne *et al*., 2009c
80	AL: 63-70d	37.8b	73.9b	44.8b	2100b	2650b	
100	R: 28*-53d	53.4a			1349a		Martignon *et al*., 2010a
75		40.5b			1118b		

£: the limitation of intake is obtained by a daily manual distribution of a defined quantity of pellets.
$: in percent of the voluntary intake (100%= *ad libitum*); R= restriction period; AL = *ad libitum* period
*: age at weaning; a-c: significant difference between AL and R, within the same study.

As showed in the figure 1, the growth reduction is globally lower than the intake reduction, during the post-weaning restriction period: for a 20% intake reduction, the growth reduction is meanly of 15.6%. For example, at the end of the restriction period the live-weight is reduced by 7 to 10% for restriction levels of 15 to 25% (Table 1, Boisot *et al*., 2003; Bergaoui *et al*., 2008; Gidenne *et al*., 2009a, b). Additionally, the impact of an intake limitation on weight gain is generally more severe at the beginning of the restriction period (often just after weaning) than after (Martignon *et al*., 2010a; Gidenne *et al*., 2009c). Moreover, the growth reduction seems also higher for a high digestible energy concentration in the feed (Duperray and Guyonvarch, 2009; Gidenne *et al*., 2009c).
Another interesting point is that the intra-cage variability is not affected by the restriction strategy (Tudela and Lebas, 2005). Thus, it shows that, in the same cage, heavy rabbits did not over-eat compared to lighter one (because of the feeding behaviour with numerous meals). This confirms that the growing rabbit adapts very well to intake limitation strategies (see also section following paragraph "Impact of a post-weaning feed restriction on feeding behaviour, welfare and digestive health").
During the restriction period, the feed conversion (FC) is generally slightly reduced (5 to 10%) or similar for R compared to AL rabbits (Figure 1), with a relatively large variations according to studies. In fact, the impact of an intake reduction on the FC is apparently dependant of the diet composition. For instance, for a high DE concentration Gidenne *et al*. (2009c) did not find any effect of the restriction on FC, while for a standard DE content it was reduced by 10% (Table 2).
After restriction, when animals are again fed *ad libitum*, a compensatory growth was always found, and the intensity of this compensatory growth is related to the intensity of the restriction (Table 1). For a 40% restriction the weight gain could 20 to 30% over the weight gain of control (always fed AL), and could reach very high value, such as almost 74 g/d (Table 3; Gidenne *et al*., 2009c). The remarkable ability of the young rabbit for a compensatory growth after a restriction period was already outlined almost 30 years ago (Lebas and Laplace, 1982; Ledin, 1984) and more recently using various restriction techniques (Table 2 and Tumova *et al*., 2002; Matics *et al*., 2008). Nevertheless, even after two weeks of a free intake, the slaughter weight of restricted rabbits remains 5 to 10% lower than control.
But, the most interesting point is that the intake of R rabbits remains generally low-

er or similar to control. Accordingly, the feed conversion was then highly improved for R animals reaching a reduction of 40% to 50% for a 30 to 40% restriction (Table 2). This FC improvement was observed whatever the diet composition. After a restriction period, contrary to what was expected, no over intake was observed, that is at *"the origin"* of the better FC. Possibly, the rabbits cannot overeat, even after a hard restriction, because its stomacal volume cannot be enlarged quickly, and is more adapted to numerous meals (Gidenne and Lebas, 2006).

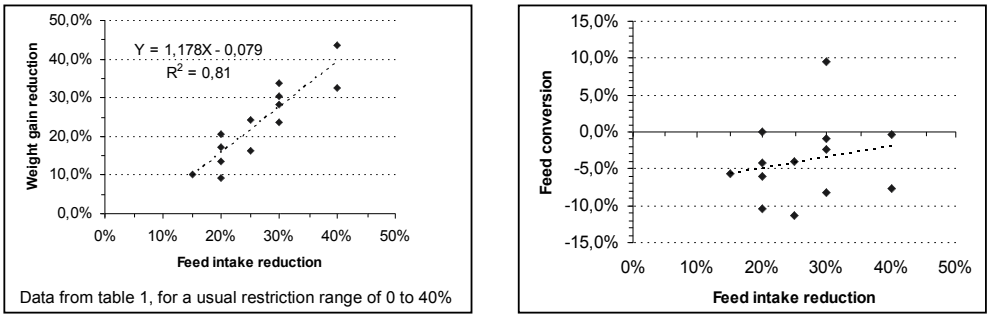

Figure 1 – Growth and feed conversion reductions according to the intake reduction, during the post-weaning restriction phase of the growing rabbit.

Therefore over the whole fattening period (R+AL period), and depending of the intake limitation strategy chosen, the final live weight of restricted rabbits is obviously lower compared to control (Table 1). But after returning to a free feeding the growth impairment is lower than expected since a compensatory growth occur without an over consumption. Thus, the overall feed conversion is generally improved by 10 to 20% after the application of a post-weaning strategy of intake restriction (Table 2). Consequently, when an intake limitation strategy is applied, the margin on the feed cost is generally improved by 2 to 10% (Duperray and Guyonvarch, 2009). Nevertheless, in one recent study performed on spanish rabbit breeding system (Romero *et al.*, 2010), a sharp impairment of the growth and feed conversion was found after a 2 weeks restriction (35-49d, about 80% of AL), that questioned about the economic pertinence of such a strategy in these conditions.

Table 2 – Post weaning quantitative[£] reduction of the feed intake and feed conversion of the rabbit.

Intake level[$]	Restriction // *ad libitum* period	Feed conversion (R)	Feed conversion (AL)	Feed conversion, whole period (R+AL)	Reference
100	R:	3.75a			Lebas and Laplace, 1982
70	35-56d	4.11b			
100	R: 35*-56d			3.74a	
70	AL:			3.66ab	Perrier, 1998
50	56-77d			3.56b	

Intake level$	Restriction // *ad libitum* period	Feed conversion (R)	Feed conversion (AL)	Feed conversion, whole period (R+AL)	Reference
100	R: 28*-49d	2.19a		2.93a	Jérome *et al.*, 1998
80	AL: 63-70d	1.96b		2.73b	
100	R: 34*-58d	2.36a	4.37a	3.13a	Boisot *et al.*, 2003
80	AL:	2.26ab	3.21b	2.70b	
60	56-70d	2.18b	2.85c	2.57b	
100	R: 32*-53d	2.19	4.04a	2.75a	Foubert *et al.*, 2008a
70	AL: 53-67d	2.17	2.89b	2.49b	
100	R: 42-77d	3.93a			Bergaoui *et al.*, 2008
85		3.71ab			
70		3.61b			
100	R:	2.49	2.93a	2.69a	Gidenne *et al.*, 2009a
80	35*-54d	2.49	2.43b	2.54b	
70	AL:	2.43	2.32bc	2.46bc	
60	54-70d	2.48	2.02c	2.38c	
100	R: 35*-63d	2.99a	4.84a	3.31a	Gidenne *et al.*, 2009b
75	AL: 63-70d	2.65b	4.53b	3.04b	
100	R: 35*-63d	2.83a	3.15a	2.85a	Gidenne *et al.*, 2009c
80	AL: 63-70d	2.66b	2.30b	2.55b	
100	R: 28*-53d	2.19			Martignon *et al.*, 2010a
75		2.10			

£: the limitation of intake is obtained by a daily manual distribution of a defined quantity of pellets.

$: in percent of the voluntary intake (100%= *ad libitum*); R= restriction period; AL = *ad libitum* period

*: age at weaning; a-c: significant difference between AL and R, within the same study.

Organ development, slaughter yield and carcass characteristics

In parallel to a post-weaning growth reduction, a restriction strategy also modifies the body composition. According to the general rule tissues allometry deposition (Cantier *et al.*, 1969; Dalle Zotte and Ouhayoun, 1998), the restriction leads to changes in differential growth for the internal organs (liver, digestive tract, etc.) and tissues (muscles, fat, etc.). According to Pálsson (1955), early development tissues (bones, digestive tract) should be more impaired during the restriction comparatively to late ones (muscles and adipose tissue). Thus, the digestive tract development (organ weight) is impaired during the restriction (Schlolaut *et al.*, 1978, Perrier et Ouhayoun, 1996). In return, after a restriction period, during the compensatory growth associated to a free intake (AL) the growth of digestive organs is very high (Ledin, 1984). For instance, at slaughter, the stomach and digestive organs (such as the liver) are proportionally heavier comparatively to AL animals (Lebas and Laplace, 1982). However, this increased development of the digestive tract would be dependant of the restriction strategy and of the weight gain (Jérome *et al.*, 1998). Finally, the weight of the full digestive tract (organ + digesta) is about 10% higher (Table 3) and participates

significantly to the body compensatory growth. But, the increased in digesta content seems the major factor of increase of the full digestive tract. Accordingly, the dressing out (slaughter yield) is reduced by about 2 unit (Table 3), and seemed not closely dependant of the restriction strategy (duration or level of intake). In addition, a minimum length for the restriction period seems necessary, since Tumova *et al*. (2006) did not find any change in dressing percentage for a moderate restriction (70% of AL for 1 or 2 weeks and a re-feeding period of 2 weeks).

Table 3 – Impact of a post weaning quantitative£ reduction of the feed intake on the slaughter yield and some carcass characteristics of the rabbit.

Intake level$	Restriction // *ad libitum* period	Full digestive tract weight (% LW)	Dressing out, %	P+IS$^{\mu}$ fat (% LW)	Reference
100	R: 28*-49d	17.9	58.3		Jérome *et al*., 1998
80	AL: 63-70d	18.9	56.9		
100	R: 35*-60d		70.2a	1.7a	Bovera *et al*., 2008
80	AL:60-81d		67.6b	1.3b	
100	R: 32*-53d		57.5	2.3a	Foubert *et al*., 2008a
70	AL: 53-67d		56.6	1.6b	
100	R: 42-77d	20.1a	56.4a	1.9	Bergaoui *et al*., 2008
85		21.1ab	55.3b	1.7	
70		23.4b	54.1c	1.3	
100	R:		56.1a		Gidenne *et al*., 2009a
80	35*-54d		54.6b		
70	AL:		55.4b		
60	54-70d		54.8b		
100	R: 35*-63d	16.8a	56.4a	2.3a	Gidenne *et al*., 2009d
75	AL: 63-70d	19.8b	54.5b	1.7b	

£: the limitation of intake is obtained by a daily manual distribution of a defined quantity of pellets.

$: in percent of the voluntary intake (100%= *ad libitum*); R= restriction period; AL = *ad libitum* period

*: age at weaning; a-c: significant difference between AL and R, within the same study.

μ: P+IS= perirenal + interscapular fat

a, b: significant difference between AL and R, within the same study.

Reversely, after re-feeding freely, although the growth increase should profit more to tissues and organs having a late development (such fatty tissues, Ouhayoun, 1998), at slaughter the carcass fattening level remains lower whatever the restriction strategy used: the weight of perirenal and interscapular fat is about 0.5 unit (%) lower, and seemed related negatively to the intake level (Table 3). Besides, Gondret *et al*. (2000) showed that changes in the nutritional status (through a feed restriction) regulate intramuscular lipid deposition, without changing fibre-type composition.
Besides, a restriction strategy seemed not to modify other carcass characteristics or meat quality, such as carcass conformation, meat colour, cooking losses, meat/bone ratio water holding capacity, pHu, fibre type, (Perrier, 1998; Dalle Zotte *et al.,* 2005; Tumova *et al*., 2006; Gidenne *et al*., 2009a, d).

IMPACT OF A POST-WEANING FEED RESTRICTION ON DIGESTIVE PHYSIOLOGY

Impact of reduced intake on feed digestion and rate of passage.

The improvement of the feed conversion (Table 2) during the restriction and moreover after restriction (during re-feeding freely) should be associated to an improved feed digestion. Effectively, most of the studies reported an improvement of the faecal digestibility, either during restriction (Table 4), or after restriction during re-feeding freely (Table 5).

Table 4 – Impact of a post weaning reduction of the feed intake on the nutrient digestion.

		Digestibility coefficient**: unit deviation from the control (AL= 100)			
Intake level$	**Restriction // *ad libitum* period**	**organic matter**	**crude protein**	**N.D.F**	**Reference**
100	R: 35*-72d	66.8a	77.9a		
50		71.0c	84.0c		Ledin, 1984a
60		68.2b	82.0b		
100	R:about 45d-75d	57.5a	64.6a	27.8	Ledin, 1984b
60		66.8b	74.3b	52.3	
100	R:40-64d	63.7a	70.0a	19.6	Xiccato *et al.*, 1992
75		64.7b	72.5b	20.0	
100	R: 45-60d	76	85	25	
60	(digestibility calculated for the 15d period)	75	87	23	Diaz Arca *et al.*, 1999
40		74	86	21	
10		73	85	-0.13	
100	R*35-85d	63.5a	79.8	19.1a	Di Meo *et al.* 2007
90		66.0b	79.9	24.5b	
100	R 42-49d	39.2	68.6a		Tumova *et al.* 2007
≈60		44.2	70.6b		
100	R:35*-54d	71.9	82.1	29.9	Gidenne and Feugier, 2009
80		71.7	82.1	29.3	
70		72.7	83.5	30.1	
60		72.8	83.7	30.1	
100	R: 35*-63d	64.2a	72.0	29.1a	Gidenne *et al.*, 2009c
80	control diet	58.1b	71.0	17.0b	
100	R: 35*-63d	63.8a	73.7	32.5a	
80	high DE diet	68.9b	80.8	40.9b	
100	R: 35*-63d	60.3a	70.1a	14.5	Gidenne *et al.*, 2009d
75		62.7b	76.2b	17.3	

$: in percent of the voluntary intake (100%= *ad libitum*) ; R= restriction period.

*: age at weaning ; a-c: significant difference between AL and R, within the same study.

**: digestibility measured during the restriction period; µ: digestibility calculated at 77d, with a marker procedure.

However, this improvement is not consistent according to the restriction intensity and its duration, and according to the diet composition. For instance, only 7 days after the application of the restriction strategy, the faecal digestibility coefficient of the organic matter (or energy) was not significantly affected, even for a 40% reduction of the intake level (Gidenne and Feugier, 2009). Without a delay of adaptation, Diaz Arca *et al*. (1999) failed to detect an effect of the intake level on digestion, even when the intake was reduced to 10% of the voluntary food consumption.

Table 5 – Nutrient digestion of the growing rabbit, previously restricted.

		Digestibility coefficient**: unit deviation from the control (AL= 100)			
Intake level$	**[Restriction] // *ad libitum* period**	**organic matter**	**crude protein**	**N.D.F**	**Reference**
100	[R: 35*-72d]	65.3ab	74.4a		
50	AL: 72-99d	63.9a	73.7a		Ledin, 1984a
60		66.7b	77.3b		
100	[R: 42-56d]	53.9	77.2		Tumova *et al*., 2007
≈60	AL : 56-63d	61.8	78.7		

$: in percent of the voluntary intake (100%= *ad libitum*); R= restriction period; AL = *ad libitum* period
*: age at weaning; a, b: significant difference between AL and R, within the same study.
: digestibility measured **after the restriction period, when rabbits are again fed *ad libitum*.

During intake restriction, an improvement of the growing rabbit digestion seems thus to be reached only after an adaptation delay, of at least 8 to 10 days. An increase in protein digestion was often observed for growing rabbits (Xiccato *et al*., 1992; Gidenne and Feugier, 2009), or for adult rabbits (Lebas, 1979; Xiccato and Cinetto, 1988, Fodor *et al*., 2001). Similarly, in these studies the authors found in restricted animals a better digestive efficiency for energy, but few improvements in lipid or fibre digestion. After restriction, since the feed conversion is sharply improved, we expect logically a sharp increased in digestion efficiency. But, few studies deal with this point (Table 5) and results are not consistent.

Besides, the impact of the restriction seems lower in heavier or adult rabbits: Ledin (1984b) find slight changes in digestibility, while Gidenne (1987) did not find any significant changes in the digestion of high-fibre diets. In return, Lebas (1979) obtained a higher digestibility for restricted pregnant females.

Since the data of literature report large variations for the relationship between digestion and restriction, we can assume that the chemical composition of the feed would play a key role. For instance, a significant interaction have

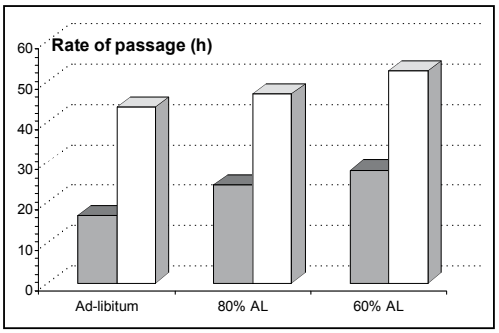

Figure 2 – Rate of passage according to the intake level of the growing rabbit (Gidenne and Feugier, 2009).

been outlined by Gidenne *et al*. (2009c), between intake level and DE dietary concentration on the faecal digestibility (Table 4), and should be further explained.
Improvement in digestion could originate in physiological changes in the intestine (enzymes secretion, mucosa absorption, etc.), and for instance in a longer retention time of digesta particles in the caeco-colic segment. A 40% reduction of the intake level led to a 65% increase in the retention time of particles (Figure 2). With similar intake levels, a similar increase in digesta retention was observed by Ledin (1984b), while with more fibrous diets Gidenne *et al*. (1987) reported only a 25% increase. Longer retention time in restricted rabbits originated mainly from the first 24 h of marker excretion. However, the impact of the intake level should be more precisely measured, by maintaining a similar delay between marker administration and caecotrophy, that is largely moved in restricted compared to AL rabbits (Laplace and Lebas, 1975; Gidenne and Lapanouse, 1997). Reversely, Fioramonti and Ruckebush (1974) observed no motricity response of the caecum in the rabbit fed *ad libitum*, probably because the caecum is constantly in a repletion status. In return, when adapted to eat in one meal (and thus restricted), there is an increased frequency of caecal contractions before the meal time. Moreover, hungry animals ate a high quantity of food in a short time, and this prolonged the motor activity of the small intestine (Ruckebusch *et al*., 1971). Therefore, applying a restriction strategy to rabbits probably modifies the motor activity in all segments of the tract, and between meals there is a period with a digestive vacuity.

Restriction and digestive physiology

Applying a reduced intake after weaning may impair the maturation of the gut, that evolved quickly in the young rabbit. For instance, the ileal *villus* height and area and crypt depth increased after weaning (Gallois *et al*., 2005), but was not affected by a 25% reduction of the intake from 28 d (weaning) to 53 d of age (Martignon *et al*., 2010a). Also, it is acknowledged that the digestive enzyme secretion is related to substrate availability (i.e. intake level). But, under restriction, ileal maltase activity was not affected (Martignon *et al*., 2010a), and further studies should be realized.
Intake restriction obviously increases the appetite, since the young rabbits eat their ration in 6 to 10 h instead of 24 h (see "Feeding behaviour and welfare" section). Accordingly, the flow of *digesta* in the stomach is rather high just after the feed distribution. Thus, in both stomach parts (antrum and fundus) a higher pH was found for restricted animals compared to control ones (Gidenne and Feugier, 2009; Martignon *et al*., 2010a). This decrease in pH is probably transitory and might be related to a dilution of secreted gastric acidity because of the large meal eaten by restricted animals in a reduced time.
Reversely, in the caecum, lower caecal pH was observed for restricted rabbits and was related to higher VFA concentration (Gidenne and Feugier, 2009). However, since the transit of digesta is about 4 to 6 h from mouth to ileum, a high flow of digesta enter the caecum at 13:00 for restricted animals, thus leading to a "peak" of fermentation (Gidenne and Bellier, 1992). In return, Maertens and Peeters (1988) or Taranto *et al.* (2003) observed a higher pH and a lower VFA concentration in the caecum of young restricted rabbits, since measurements were done in the morning (9-10 h) just after meal distribution and thus before the peak of digestion in the caecum. Therefore, when the cae-

cal sampling occurred within a similar delay from the meal (or the main intake period for AL rabbits), as done by Martignon *et al.* (2010a), the intake limitation seemed not to greatly influence the physico-chemical parameters (pH, VFA) of the caecal biotope, although the redox potential was slightly reduced. Besides, the fibrolytic activity of the caecal bacteria is not affected by the intake level (Gidenne and Feugier, 2009; Martignon *et al.*, 2010a). Similarly, the intake level had no significant effect on the number of bacterial 16S rDNA copies per gram of caecum content, and did not influence the bacterial community structure or diversity (Martignon *et al.*, 2010a). This lack of effect can be due to both the relatively constant composition of the material entering the caecum located at the end of the digestive tract and the buffering capacity of the caecal content. However, the bacterial diversity and structure was approached through a CE-SSCP profiles analysis that only took the major bacterial populations into account. More targeted analyses of *Archaea* or of some predominant bacteria species of the caecal microbiota, such as *Firmicutes* or *Bacteroidetes,* could reveal changes that were not addressed by the fingerprint approach, and that may explain the higher resistance of the restricted rabbits to digestive troubles (see "Digestive health of the growing rabbit according to the intake level after weaning" section).
In the same way, the immune status of restricted rabbits was shortly described through some blood characteristics, such as the cell profile. For instance, Tumova *et al.* (2007) reported an increased number of lymphocytes in restricted rabbits. However, the immune status of the growing rabbit is still very scarcely studied.

IMPACT OF A POST-WEANING FEED RESTRICTION ON FEEDING BEHAVIOUR, WELFARE AND DIGESTIVE HEALTH

Feeding behaviour and welfare

As shown in the figure 3, the rabbit adapts very quickly to a restriction strategy, with a very high intake just after the feed distribution, that reached 40% of the daily intake (within two hours) only 8 days after the application of the intake restriction, and decreased to 32% 10 days later (Martignon *et al.*, 2009).

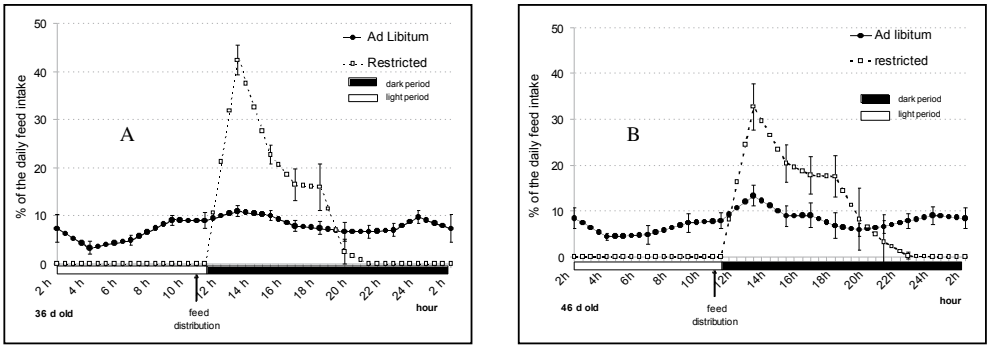

Figure 3 – Feed intake patterns at 36 d (A) and 46 d (B) of age according to the intake level: ad libitum vs. restricted (75% of AL) after weaning at 28 d.

In comparison, the rabbit fed freely shows a relatively smooth intake behaviour, with numerous meals, characterised by a maximum of 10% of the daily intake 2 to 4 h after lighting out, and a minimal intake 2-4 h after lighting, that correspond probably to the caecotrophy period. Over the day, the whole meal is totally consumed within 8 hours, for 10 weeks old rabbits restricted at 85% of the AL and having one feeder (1F) in their cage (Figure 4, Tudela and Lebas, 2006), meaning that the rabbit starved for 14 hours a day. Contrary to what was expected, when the rabbit have two feeders (2F), the competition for feeding is reduced and they ate more slowly: the whole meal is consumed within 12h instead of 8h (Tudela and Lebas, 2006). Obviously for higher restriction level, the duration of the starvation increases, but it also depends of the voluntary intake level of the rabbit: for example under a hot climate, Bergaoui *et al.* (2008) reported that the whole meal was consumed within 16 h for a 85% intake level (and within 10 h for a 70% intake level).

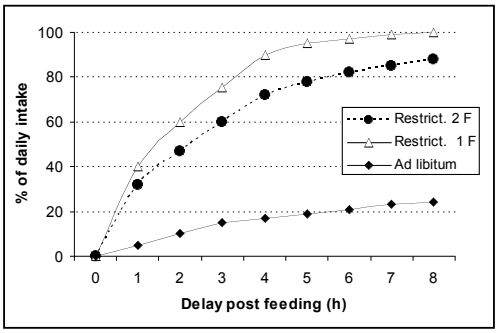

Figure 4 – Intake pattern for restricted (85% of AL) and ad libitum rabbits (10 weeks old).

As expected, restricted rabbits showed a strong feeding activity during the first hours following the feed supply, with an average of 4 out of 6 rabbits eating (Martignon, 2010). Conversely, *ad libitum* rabbits had a feeding activity quite balanced along a the day, with two main feeding periods: at the first hour of the dark period (1.7 out of 6 rabbits eating) and 2 hours before the lightening period (2 out of 6 rabbits). Although the feeder was empty, the restricted rabbits continued to visit the feeder until the next feed supply. The number of meals and the total duration spent to eat during a 24 h period were sharply lower for restricted rabbits compared to the AL : n=27 for 2h30min, and n=41 for 3h17min for AL.

Simultaneously the number of drinks is also reduced: n=38 *vs.* 47 for R and AL rabbits (Martignon, 2010). But in fact the quantity of water consumed is higher for restricted rabbits. As reported by Boisot *et al.* (2005), the ratio feed to water is doubled for rabbits restricted to 65% of AL, passing from 1.68 to 3.46 (Figure 5). These authors also reported that a similar 35% reduction of the intake could be obtained with a one hour access to the drinker, and then the ratio water/feed fell to 1.20. Such a water restriction strategy, used for experimentation, is not encouraged in field condition, since it is questionable respect to the welfare of the animal.

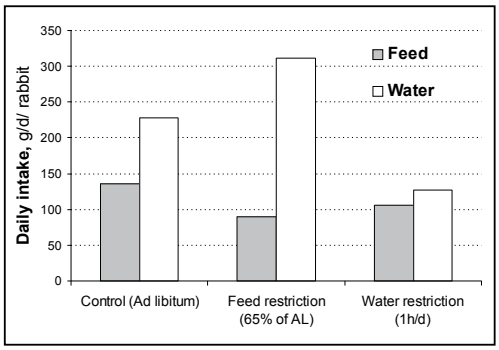

Figure 5 – Water and solid feed intake for restricted growing rabbits, either through a reduced quantity of pellets, or through a reduced time access to drinker.

Once rabbits are fed freely again, their circadian eating and drinking activity was higher compared to control animals (number of meals = 48 for R *vs.*. 38 for AL; total meal duration = 4h17min *vs.*. 2h32min for AL; number of drinks = 40 for R *vs.*. 36 for AL), and it re-adapt very quickly (within two or three days) to a "classical" feeding behaviour, balanced along 24 hours (Martignon, 2010).
Face to these abrupt changes in feeding behaviour, the faecal excretion pattern, including caecotrophy is deeply modified, as shown in figure 6. For restricted rabbits, the faecal excretion peak occurred between 5 to 8 hours after the feed supply, thus about three to four hours later than the eating peak. Accordingly, the caecotrophy period is moved and is located about 8 to 10 h after the feed distribution, as already observed by Fioramonti and Ruckebusch (1974) on adult rabbits fed one time a day. In return, the ratio soft to hard faces seemed not modified (Martignon, 2010).
Since for restricted rabbits the competition to access the feeder is high during the first hour after the feed distribution, we expect some hostile even aggressive behaviour. In fact, Martignon (2010) did not observe any increase of aggressiveness and no more lesions for R rabbits. In consequence, applying a short-term restriction strategy will not completely follow one the 5 rules of the Farm Animal Welfare Council (http://www.fawc.org.uk/freedoms.htm): Freedom from Hunger and Thirst. However, considering a 24h period, the rabbit expressed a transitory hunger (and not thirst, except for a strategy limiting the access to drinker) and its growth is not greatly impaired for a moderate restriction (under 70% of AL). In return, a limited intake strategy will support the third rule "Freedom from Pain, Injury or Disease", since many studies report an improvement in digestive health of the young rabbit (see following section).

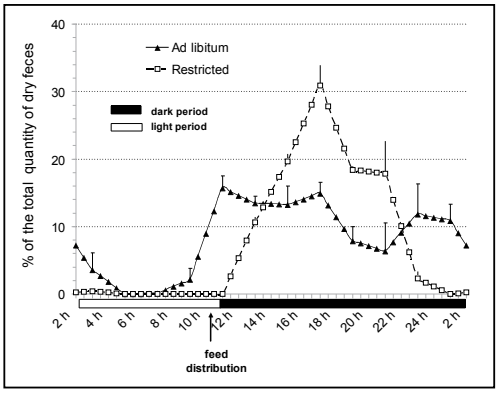

Figure 6 – Fecal excretion pattern (47 d old), according to the intake level: ad libitum vs. restricted (75% of AL) after weaning at 28 d.

Digestive health of the growing rabbit according to the intake level after weaning.

Preliminary to review this point, a brief recall about the method to estimate health status of a group of animals is pertinent respect to the growing rabbit digestive health. A common indicator to evaluate the impact of a disease in breeding is the mortality rate. More recently, morbidity indicator was developed for the growing rabbit to assess more precisely the incidence of the clinical symptoms (Gidenne *et al.*, 2010), and it could be combined with mortality to obtain the health risk index ("HRi"= morbidity + mortality rate). This approach allows a more precise assessment of the health status. Thus it means that a large number of animals are required to detect a significant difference between two treatments in mortality. For instance, to detect a 10% deviation among two mortality rates (at a risk level of 5%), more than about 90 rabbits

are required in each group (and over 300 rabbits to detect 5% deviation). Similarly, assessing the morbidity level, using clinical symptoms (diarrhoea, caecal impaction, etc.) is relatively easy. In return, when only a reduction of growth rate is detectable, a threshold must be defined to class the animal as morbid or not (such as the average minus 2 × standard deviation), and it needs a large set of rabbits within a group to define the mean and its range of variation. Therefore, except for specific trials implying an experimental inoculation of a pathogen, were hereunder review the results from studies using a minimal number of rabbits to assess correctly the health status according to the intake level.

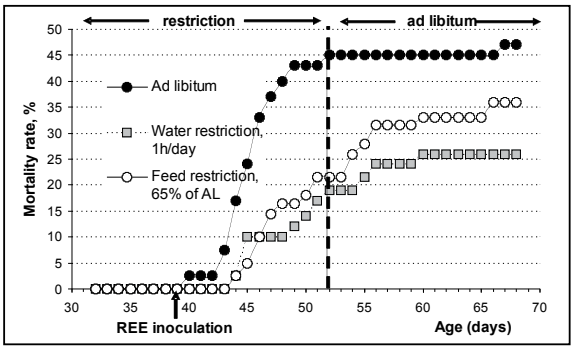

Figure 7 – Mortality rate after ERE inoculation, according to the restriction strategy.

First large-scale trials dealing with the impact of reducing the intake level on the digestive health were performed in 2002, by a French network of experimental units (n=6, GEC group). First results were published in 2003 (French Rabbit Congress), indicating a half lower mortality and morbidity rate, from spontaneous ERE or non specific enteropathy, when rabbits were submitted to a 60% intake level during three weeks after weaning (Table 6, Gidenne *et al.*, 2009a). In parallel, other trials were performed to assess if a restriction strategy would be efficient against the Epizootic Rabbit Enteropathy (ERE). For instance, Boisot *et al.* (2003) reported that a 65% intake level (or a 1 h drinking access) reduced mortality rate, after an ERE inoculation (Figure 7), and this was confirmed by the study of Foubert *et al.* (2008b). More recently, Martignon *et al.* (2010b) reported that a restriction at 80% of AL had no significant impact for rabbits infected experimentally with an enteropathogenic *E. coli* (0128:C6), and she did not detect a favourable effect of the restriction under a spontaneous colibacillosis (Martignon *et al.*, 2009). Therefore, further studies are necessary to confirm this differential effect of the intake level for this two digestive pathology, and to understand the underlying physiological mechanisms implicated.

Using large scale experimental design (over 400 rabbits per group on several sites), Gidenne *et al.* (2009a) showed an almost half reduction of the mortality and morbidity for restricted animals (Table 6), for a minimum level of intake reduction of 20%. This effect was confirmed in a further study (Gidenne *et al.*, 2009b), where no effect of distributing the meal in one or two times was detected on health status. Martignon *et al.* (2009) confirmed that the favourable impact of the restriction originated clearly from the quantity of feed distributed and not from the distribution procedure. However, this favourable impact of a reduced intake seems to occur only during the "restriction" period, and is not prolonged when animal return to a free intake (Gidenne *et al.* 2009a; Romero *et al.*, 2010). Similar results were also obtained by reducing the intake level through a time limited access to drinking water (Boisot *et al.,* 2004; Verdelhan *et al.*, 2004, Elmaghraby, 2011).

Since a lower intake led to growth reduction, Gidenne *et al.* (2009c) compared stand-

ard to high-energy feed, for *ad libitum* or restricted growing rabbits, to obtain a favourable impact on health without growth impairment. Unfortunately, first results indicated that restricting rabbits with a high-energy feeds seemed not as efficient as a standard feed to "protect" against digestive troubles. Szendrő *et al*. (2008) reached similar conclusions using two rabbit lines.

Table 6 – Impact of a post weaning reduction of the feed intake on the mortality and morbidity from digestive troubles in the growing rabbit.

		Restriction period		Whole period (R+AL)		
Intake level$	**Restriction // *ad libitum* period**	**Mortality, %**	**Morbidity, %**	**Mortality, %**	**Morbidity, %**	**Reference**
100	R:35*-54d	12.2a	12.0a	17.6a	11.9a	Gidenne *et al*., 2009a
80	AL:54-70d	5.5b	11.2a	12.4b	11.2ab	
70	(n=496 rab./	5.4b	5.4b	15.0ab	6.7b	
60	group)	2.8b	6.7b	11.9b	5.6b	
100	R: 35*-63d	19.9a	15.3a	21.6a	18.7a	Gidenne *et al*., 2009b
75	AL: 63-70d (n=503 rab./ group)	10.7b	10.2b	11.9b	14.0b	
100	R: 35*-63d	30.6a	21.1			Gidenne *et al*., 2009c
80	(n=170 rab./ group)	25.3b	19.4			
100	R:28*-51d	5.6	13.8			Martignon *et al*., 2009
80	(n=160 rab./ group)	3.8	17.5			
100	R:35*-49d	22.9a	33.3a	25.6a	41.4a	Romero *et al*., 2010
85	AL: 49-63d (n=96 rab./ group)	4.2b	8.1b	6.3b	12.7b	
100	R:35*-84d	29.5a		12.5		Szendrő *et al*., 2008
90	(n=40 rab./ group)	28.1a		0		
80		4.8b		3.1		
100	R:35*-63d			12.5		Elmaghraby M. *et al*., 2011
87	AL: 63-77d			0		
73	(n=32 rab./ group)			3.1		

$: in percent of the voluntary intake (100%= *ad libitum*); R= restriction period; AL = *ad libitum* period

*: age at weaning; a, b: significant difference between AL and R, within the same study.

a, b: significant difference between AL and R, within the same study.

Finally, physiological mechanisms explaining such a favourable effect of reducing the intake level on diarrhoea incidence remained to be elicited. Many metabolic parameters are modified under restriction, as reported for the rabbit by Van Harten and Cardoso (2010). So, an interdisciplinary approach should be pertinent to explore

more precisely the response of the young rabbit under restriction or not, and to correlate the inflammatory response, the immune status or the symbiote maturation (stability, diversity) to the intake level.

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

Since 2003, strategies for limiting the intake after weaning are largely applied in France by rabbit breeders. This is combined with the improvement of materials to control the feed distribution, and particularly automatic feeding system using a chain conveyor for pellets. French private feed companies are improving the strategies to make it easy to control, such a fixed duration of feeding during the night technique (Weissman *et al*., 2009).

Presently, about 95% of the professional are using a restriction strategy with or without an automatic feeding equipment. But, over the favourable on digestive health (particularly for ERE syndrome), French breeder used a restriction strategy to reduce the feed costs, since the feed conversion of the restricted rabbit is improved. Globally, the margin on the feed cost is estimated to 0.30 € per weaned rabbit. In addition, it is possible to add a reduction of the drug consumption (estimated to about 0.10 to 0.15 € per rabbit in France). However, an economic balance improvement is also dependant of the price of the feeds, of the national market, and particularly of the slaughter weight. For instance, for light slaughter weights (such in Spain) the economic interest of the restriction strategies may be reduced (Romero *et al*., 2010).

Thus, an intake limitation strategy should be suited to every breeding situation, according to the aims of the farmers: improving health status, reducing feed costs, standardising performances, etc.

REFERENCES

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.

Boisot, P., Licois, D., Gidenne, T., 2003. Feed restriction reduces the sanitary impact of an experimental reproduction of Epizootic Rabbit Enteropathy syndrom (ERE), in the growing rabbit, In: Proc. 10ème J. Rech. Cunicoles Fr., France, pp. 267-270.

Boisot, P., Duperray, J., Dugenétais, X., Guyonvarch, A., 2004. Interest of hydric restriction times of 2 and 3 hours per day to induce feed restriction in growing rabbits, In: Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, pp. 759-764.

Boisot, P., Duperray, J., Guyonvarch, A., 2005. Intérêt d'une restriction hydrique en comparaison au rationnement alimentaire en bonnes conditions sanitaires et lors d'une reproduction expérimentale de l'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL). In: Proc. 11èmes Journ. Rech. Cunicole Fr., Paris, France.

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.

Cantier, J., Vezinhet, A., Rouvier, R., 1969. Allométrie de croissance chez le lapin. I) Principaux organes et tissus. Ann. Biol. Anim. Biochim Biophys 14:271-292.

Carabaño, R., Badiola, I., Chamorro, S., García, J., García-Ruiz, A.I., García-Rebollar, P., Gómez-Conde, M.S., Gutiérrez, I., Nicodemus, N., Villamide, M.J., De Blas, J.C., 2008. New trends in rabbit feeding: influence of nutrition on intestinal health. J. Agric. Res. 6:15-25.

Dalle Zotte, A., Ouhayoun, J., 1998. Effect of genetic origin, diet and weaning weight on carcass composition, muscle physicochemical and histochemical traits in the rabbit. Meat Sci. 50:471-478.

Dalle Zotte, A., Rémignon, H., Ouhayoun, J., 2005. Effect of feed rationing during post-weaning growth on meat quality, muscle energy metabolism and fibre properties of Biceps femoris muscle in the rabbit. Meat Sci. 70:301-306.

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

Diaz Arca, F., Perez Alba, L.M., Perez Hernandez, M., 1999. Digestibility and energy retention by young rabbits fed different levels of intake. Ann. Zootech. 48:289-295.

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.

Duperray, J., Gyonvarch, A., 2009. Effect of different quantitative feed restriction strategies on fattening performance, and interest of a high energy and protein feed. In: Proc. 13èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, France, pp. 59-62.

Fioramonti, J., Ruckebusch, Y., 1974. La motricité caecale chez le lapin. 2) Variations d'origine alimentaire. Ann. Rech. Vet. 5:201-212.

Fodor, K., Fekete, S.G., Zoldag, L., Bersenyi, A., Gaspardy, A., Andrasofszky, E., Kulcsar, M., Eszes, F., 2001. Influence of feeding intensity on corporeal development, body composition and sexual maturity in female rabbits. Acta Veterinaria Hungarica 49:399-411.

Foubert, C., Boisot, P., Duperray, J., Guyonvarch, A., 2007. Interêt d'un accès limité à la mangeoire de 6h, 8h et 10 h pqr jour pour engendrer un rationnement alimentaire chez le lapin en engraissement. In: Proc. 12èmes Journées de la recherche Cunicole, pp. 123-126.

Foubert, C., Duperray, J., Guyonvarch, A., 2008a. Intérêt d'un aliment fibreux concentré en énergie chez le lapin de chair rationné. In: Proc. of the Journée Nationale ITAVI, Pacé, France, pp. 1-8.

Foubert, C., Duperray, J., Boisot, P., Guyonvarch, A., 2008b. Effect of feed restriction with or without free access to drinking water on performance of growing rabbits in healthy or epizootic rabbit enteropathy conditions. Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, 667-671.

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

Gidenne, T., 1987. Effet de l'addition d'un concentré riche en fibres dans une ration à base de foin, distribuée à deux niveaux alimentaires chez la lapine adulte. 2/ Mesures de digestibilité. Repr. Nutr. Develop. 27:801-810.

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., Bellier, R., 1992. Etude in vivo de l'activité fermentaire caecale chez le lapin. Mise au point et validation d'une nouvelle technique de canulation caecale. Repr. Nutr. Develop. 32:365-376.

Gidenne, T., Lapanouse A. 1997. Rate of passage in the rabbit digestive tract: influence of marker dosing time, ileal cannulation and marker type. World Rabbit Sci., 5, 27-32.

Gidenne, T., Lebas, F., 2006. Feeding behaviour in rabbits, In: Bels, V. (Ed.), Feeding in domestic vertebrates. In: From structure to behaviour. CABI publishing, Wallingford, UK, pp. 179-209.

Gidenne, T., Feugier, A., 2009. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 1. Impact on digestion, rate of passage and microbial activity. Animal 3:501-508.

Gidenne, T., Poncet, C., Gomez, L., 1987. Effet de l'addition d'un concentré riche en fibres dans une ration à base de foin, distribuée à deux niveaux alimentaires chez la lapine adulte. 1/ Temps de séjour moyen des aliments. Repr. Nutr. Develop. 7:733-743.

Gidenne, T., Combes, S., Feugier, A., Jehl, N., Arveux, P., Boisot, P., Briens, C., Corrent, E., Fortune, H., Montessuy, S., Verdelhan, S., 2009a. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. Animal 3:509-515.

Gidenne, T., Murr, S., Travel, A., Corrent, E., Foubert, C., Bebin, K., Mevel, L., Rebours, G., 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 résultats d'une étude concertée du réseau GEC. Cuniculture Magazine 36:65-72.

Gidenne, T., Bannelier, C., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., 2009c. Interaction between the energetic feed concentration and the restriction strategy - impact on feeding behaviour, growth and health of the rabbit. In: Proc. 13ème J. Rech. Cunicoles, Paris., Le Mans, France, pp. 63-66.

Gidenne, T., Travel, A., Murr, S., Oliveira, H., Corrent, E., Foubert, C., Bebin, K., Mevel, L., Rebours, G., Renouf, B., Gigaud, V., 2009d. Restricted intake and feed distribution mode – impact on feeding behaviour, digestion and carcass quality. In: Proc. 13ème J. Rech. Cunicoles, Paris., Le Mans, France, pp. 43-46.

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

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., Messager, 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.

Laplace, J.P., Lebas, F., 1975. Le transit digestif chez le lapin. 3) Influence de l'heure et du mode d'administration sur l'excrétion fécale du Cérium 41 chez le lapin alimenté *ad libitum*. Ann. Zootech. 24:255-265.

Lebas, F., Delaveau A., 1975. Influence de la restriction du temps d'accès à la boisson sur la consommation alimentaire et la croissance du lapin. Ann. Zootech. 24:311-313.

Lebas, F., 1979. Efficacité de la digestion chez la lapine adulte. Effet du niveau d'alimentation et du stade de gestation. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 19:969-973.

Lebas, F., Laplace J.P., 1982. Mensurations viscérales chez le lapin. 4. Effets de divers modes de restriction alimentaire sur la croissance corporelle et viscérale. Ann. Zootech. 31:391-430.

Ledin, I., 1984a. Effect of restricted feeding and realimentation on growth, carcass composition and organ growth during the first seven days of realimentation in rabbit. Acta Agric. Scand. 34:54-66.

Ledin, I., 1984b. Effect of restricted feeding and realimentation on compensatory growth and organ growth in rabbit. Ann. Zootech. 33:33-50.

Maertens, L., Peeters J.E., 1988. Effect of feed restriction after weaning on fattening performances and caecal traits of early weaned rabbits. In: Proceedings of the Deutsche Veterinarmediznische Gesellschaft, Celle, Germany, pp. 158-169.

Marlier, D., Dewree, R., Delleur, V., Licois, D., Lassence, C., Poulipoulis, A., Vindevogel, H., 2003. A review of the major causes of digestive disorders in the European rabbit. Ann. Med. Vet. 147:385-392.

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.

Martignon, M.H., Combes, S., Gidenne, T., 2009. Effect of the feed distribution mode in a strategy of feed restriction: effect on the feed intake pattern, growth and digestive health in the rabbit. In: Proc. 13ème J. Rech. Cunicoles, Le Mans, France, pp. 39-42.

Martignon, M.H., Combes, S., Gidenne, T., 2010a. Digestive physiology and hindgut bacterial community of the young rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): Effects of age and short-term intake limitation. Comp. Bioch. Physiol.- Part A 156:156-162.

Martignon, M.H., Reperant, E., Valat, C., 2010b. Digestive response of young rabbits to an experimental reproduction of colibacillosis according to two feeding strategies. In: Proc. Prato Conference on the Pathogenesis of Bacterial Diseases of Animals, Prato, Italy.

Matics, Z.S., Dalle Zotte, A., Radnai, I., Kovács, M., Metzger, S.Z., Szendrő, Z.S., 2008. Effect of restricted feeding after weaning on the productive and carcass traits of growing rabbits. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 741-745.

Ouhayoun, J., 1998. Influence of the diet on rabbit meat quality, In: C. De Blas, J. Wiseman J. (eds.), The nutrition of the rabbit. CABI Publ., Wallingford, UK, pp. 177-195.

Palsson, H., 1955. Conformation and body composition. In: Progress in the physiology of farm animals. Vol. II. Butterworth, London, p. 430.

Perrier, G., 1998. Influence de deux niveaux et de deux durées de restriction alimentaire sur l'efficacité productive du lapin et les caractéristiques bouchères de la carcasse. In: Proc. 7èmes Journées de la Recherche Cunicole, Lyon, France, pp. 179-182.

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.

Prud'hon, M., Cherubin, M., Goussopoulos, J., Carles, Y., 1975. Evolution au cours de la croissance des caractéristiques de la consommation d'aliments solides et liquides du lapin domestique nourri ad libitum. Ann. Zoot. 24:289-298.

Romero, C., Cuesta, S., Astillero, J.R., Nicodemus, N., De Blas, C., 2010. Effect of early feed restriction on performance and health status in growing rabbits slaughtered at 2 kg live-weight. World Rabbit Sci. 18:211-218.

Ruckebusch, Y., Grivel, M.L., Fargeas, M.J., 1971. Activité électrique de l'intestin et prise de nourriture conditionnelle chez le lapin. Physiol. Behav. 6:359-366.

Schlolaut, W., Lange, K., Schluter, H., 1978. Influence de l'intensite alimentaire sur les performances d'engraissement et la qualité de carcasse chez le lapereau à l'engrais. Zuchtungskunde 50:401-411.

Szendrő, Z., Szabo, S., Hullar, I., 1988. Effect of reduction of eating time on production of growing rabbits. In: Proc. 4th World Rabbit Congress, Budapest, Hungary, pp. 104-114.

Szendrő, Z., Metzger, S., Fébel, H., Hullár, I., Maertens, L., Bianchi, M., Cavani, C., Petracci, M., Biró-Németh, E., Radnai I., 2008. Effect of energy restriction in interaction with genotype on the performance of growing rabbits I: Productive traits. Livestock Sci. 118:123-131.

Taranto, S., Di Meo, C., Stanco, G., Piccolo, G., Gazaneo, M.P., Nizza, A., 2003. Influence of age at weaning on caecal content characteristics and post-weaning performance and health of rabbits. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 16:1540-1544.

Tudela, F., Lebas, F., 2006. Modalités du rationnement des lapins en engraissement. Effets du mode de distribution de la ration quotidienne sur la vitesse de croissance, le comportement alimentaire et l'homogénéité des poids. Cuniculture Magazine 33:21-27.

Tumova, E., Skrivan, M., Skrivanova, V., Kaceri*vs*.ka, L., 2002. Effect of early feed restriction on growth in broiler chickens, turkeys and rabbits. Czech J. Anim. Sci. 47:418-428.

Tumova, E., Skrivanova, V., Skrivan, M., 2003. Effect of restricted feeding time and quantitative restriction in growing rabbits. Archiv. Geflügelk. 67:182-190.

Tumova, E., Zita, L., Stolc, L., 2006. Carcass quality in restricted and ad libitum fed rabbits. Czech J. Anim. Sci. 51:214-219.

Tumova, E., Zita, L., Skrivanova, V., Fucikova, A., Skrivan, M., Buresova, M., 2007. Digestibility of nutrients, organ development and blood picture in restricted and ad libitum fed broiler rabbits. Archiv. Geflügelk. 71:6-12.

Van Harten, S., Cardoso, L.A., 2010. Feed restriction and genetic selection on the expression and activity of metabolism regulatory enzymes in rabbits. Animal 4:1873-1883.

Verdelhan, S., Bourdillon, A., Morel-Saives, A., Audoin, E., 2004. Effect of a limited access to water on mortality of fattening rabbits, In: Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, pp. 1015-1021.

Weissman, D., Troislouches, G., Picard, E., Davoust, C., Leroux, C., Launay, C., 2009. Amélioration de l'indice de consommation de lapins en engraissement par une distribution nocture de l'aliment. In: Proc. 13èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, France, pp. 1-3.

Xiccato, G., Cinetto, M., 1988. Effect of nutritive level and age on feed digestibility and nitrogen balance in rabbit., In: Proc. 4th World Rabbit Congress, Budapest, Hungary, pp. 96-103.

Xiccato, G., Cinetto, M., Dalle Zotte, A., 1992. Effect of feeding plane and category of rabbit on digestive efficiency and nitrogen balance. Zootec. Nutr. Anim. 181:35-43.

Yakubu, A., Salako, A.E., Ladokun, A.O., Adua, M.M., Bature, T.U.K., 2007. Effects of feed restriction on performance, carcass yield, relative organ weights and some linear body measurements of weaner rabbits. Pakistan J. Nut. 6:391-396.

INDUZIONE DELL'OVULAZIONE NELLA CONIGLIA FATTRICE: IL PUNTO SULLO STATO DELLA RICERCA

DAL BOSCO A.

Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia, Italy
Alessando Dal Bosco, Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia,*
Borgo XX Giugno, 74, 61121 Perugia (PG), Italy - Tel. +39 075 5857110 - Fax: +39 075 5857122
*Corresponding author: dalbosco@unipg.it

ABSTRACT

Ovulation induction in rabbit does: a review

In the last 15 years the profitability of rabbit farms has increased mainly due to improvements in management and genetic selection, but several problems related to animal welfare have also occurred. This review recognises 66 scientific papers on rabbit does ovulation. In particular are reported: i) 23 papers, from 1905 to present, that have elucidated the ovulatory mechanisms in rabbit does; ii) 13 papers on the main GnRH analogues and their function; iii) 24 papers about the main parenteral treatments for inducing does ovulation and their efficacy; iv) 6 papers on the main intravaginal treatments for inducing ovulation in rabbit does and their efficacy. Considering the actual importance of innovative welfare oriented methods to induce ovulation in this species, strategies to optimize this physiological function are discussed.

Key words: Rabbit does, GnRH analogues, Ovulation, Reproductive performance.

INTRODUZIONE

L'uso dell'Inseminazione Artificiale (IA) in coniglicoltura è diventato ormai una pratica di routine nella maggior parte degli allevamenti europei e ciò ha comportato l'introduzione di una serie di operazioni e trattamenti volti alla massimizzazione delle performance e all'ottimizzazione delle risorse umane. Tra questi, come è noto, il trattamento con GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) al momento della IA si è reso indispensabile al fine di indurre l'ovulazione nella coniglia fattrice, così da supplire alla mancanza degli stimoli nervosi indotti dal maschio; tale trattamento richiede un'iniezione intramuscolare con conseguente stress per l'animale e impegno di tempo da parte dell'operatore. Attualmente sono disponibili in commercio numerosi analoghi del GnRH, di cui si parlerà in un paragrafo successivo, che presentano un basso peso molecolare e possono pertanto essere facilmente assorbiti per diverse vie (Camier *et al.*, 1989; Donnez *et al.*, 1989).
Lo scopo della presente review è quello di fare il punto sullo stato dell'arte relativo alle diverse tecniche di induzione dell'ovulazione nella coniglia fattrice, dopo aver

brevemente richiamato alcune peculiarità fisiologiche di questa specie ed alcuni concetti relativi alle sostanze ormonali oggi maggiormente utilizzate.

CENNI STORICI E RICHIAMI DI FISIOLOGIA

È ormai noto da oltre un secolo che nella coniglia l'ovulazione è normalmente indotta dal coito (Heape, 1905). Walter Heape fu un vero e proprio pioniere nello studio della fisiologia riproduttiva, tanto che il 27 Aprile del 1890 egli riuscì a trasferire degli embrioni da una coniglia ad un'altra e, nel 1905, pubblicò una prima descrizione di ovulazioni non spontanee nella coniglia, dando inizio ad una serie di studi di grande interesse per l'IA e per le produzioni animali in generale (Biggers, 1991). Da allora la coniglia è considerata un animale in estro più o meno permanente che rientra quindi nel gruppo da quelli ad ovulazione "riflessa" o "indotta" differenziandosi dai mammiferi ad ovulazione spontanea (Hammond e Marshall, 1925).
Normalmente il riflesso ovulatorio si esplica attraverso 2 vie (Lindner *et al.*, 1977):
- la via nervosa o afferente che trasmette lo stimolo al sistema nervoso centrale;
- la via umorale o efferente che trasferisce gli impulsi all'ovaia.

A questo livello si distinguono almeno tre componenti distinte:
- la ripresa del processo meiotico negli oociti;
- uno spostamento di produzione da estrogeni follicolari a progesterone con luteinizzazione precoce delle cellule della granulosa;
- la rottura della parete del follicolo con deiscenza dell'oocita.

Tutti e tre i processi sono probabilmente iniziati da un'interazione simile tra gonadotropine e recettori di membrana in appropriati compartimenti follicolari, ma la successiva espressione della risposta dipende da numerosi meccanismi fisiologici.
Potrebbe essere interessante fare una rapida carrellata degli studi che hanno condotto a tali assunti.
Inizialmente Schochet (1916) ipotizzò che il *liquor follicoli* contenesse degli enzimi proteolitici e che la rottura del follicolo dipendesse esclusivamente da questi, mentre Robinson (1918) descrisse la secrezione di un *liquor follicoli* secondario in prossimità dell'atto ovulatorio.
Le prime intuizioni che le interazioni tra coito e ovulazione avessero un'origine nervosa furono di Guttmacher e Guttmacher (1921) e Grosser (1924) i quali osservarono una forte innervazione nervosa delle cellule del follicolo e degli strati fibro-muscolari delle membrane dello stesso che risultano coinvolte nel processo di deiscenza. Solo nel 1933 Bellerby ipotizzò che nel processo di ovulazione fosse coinvolto il lobo anteriore dell'ipofisi attraverso tre assunti:
- la rilevazione di un aumento ematico di una sostanza stimolante l'ovulazione derivante dal lobo anteriore dell'ipofisi dopo il coito;
- i risultati di uno studio sugli effetti del coito su ovaie di coniglie cui era stata rimossa l'ipofisi;
- la valutazione degli effetti di un estratto di ipofisi anteriore sulle ovaie con particolare riferimento al tempo di deiscenza.

Tale Autore concluse che dopo l'accoppiamento, l'adenoipofisi secerne un ormone

(non definito in quel momento) che attiva a livello di follicolo dei cambiamenti nelle secrezioni determinandone la rottura, anche se in quel momento nulla si riusciva a dire riguardo ai fattori nervosi che stimolavano la ghiandola stessa nella secrezione. Solo molti anni dopo si definì in maniera precisa come, sotto sollecitazione di stimoli nervosi, l'ipotalamo liberasse sostanze, dette fattori di rilascio (*releasing factors*), come il GnRH, conosciuto anche come LHRH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone) o LRF (luteinizing releasing factor). Nel 1971, Andrew Schally e Roger Guillemin furono i primi ad isolare, caratterizzare e sintetizzare il GnRH, tanto da ricevere per questo il premio Nobel. Successivamente, la sostituzione di molti aminoacidi presenti nella struttura iniziale del GnRH ha portato allo sviluppo di agonisti del GnRH, composti caratterizzati da un'elevata affinità per i recettori, da una resistenza alla degradazione proteolitica e da una ridotta eliminazione renale. La sequenza di aminoacidi del GnRH è comune a tutti i mammiferi, mentre si differenzia negli uccelli, nei rettili e nei pesci e la sua secrezione è regolata da un generatore di impulsi (o oscillatore di GnRH), localizzato nell' ipotalamo mediobasale. Il GnRH è rilasciato dai neuroni ipotalamici nella circolazione portale ipofisaria ed entra poi in contatto con i suoi recettori situati sulle cellule gonadotrope dell'ipofisi anteriore, stimolando la liberazione delle gonadotropine FSH (follicolostimolante) e LH (luteinizzante). L'LH è responsabile dell'ovulazione, che avviene 10-12 h dopo l'accoppiamento per deiscenza del follicolo di Graaf. Il GnRH stimola inoltre la produzione di estradiolo, progesterone, 20α di-idrossiprogesterone e prostaglandine, inducendo anche la liberazione di ossitocina che favorisce l'ovulazione. L'ipotalamo produce inoltre molte endorfine che non esplicano azione diretta sull'ipofisi, come i *releasing factors*, ma modulano le secrezioni ormonali *in loco*. Così, un elevato livello di endorfine, conseguente a condizioni di stress, interferisce sulla produzione di GnRH e quindi di gonadotropine. Nell'ovario maturo i follicoli si sviluppano e regrediscono continuamente, cosicché il numero di quelli in fase preovulatoria è quasi sempre costante.

Se la coniglia non si accoppia i follicoli ovarici mantengono secondo alcuni Autori notevoli dimensioni (circa 1,2-1,5 mm di diametro) per 12-16 giorni, mentre secondo altri si mantengono per soli 7-10 giorni (Shibata, 1931; Hill *et al.*, 1933; Buttner e Wienert, 1935).

In concomitanza con il picco di LH si verifica a livello ovarico una liberazione di prostaglandine che potrebbero avere un ruolo nell'indurre la rottura del follicolo in corrispondenza dello stigma. A questo proposito Thebault *et al.* (1983) hanno descritto l'azione del tessuto interstiziale del follicolo e della Prostaglandina E_2 nei meccanismi intra-ovarici di deiscenza dello stesso. Un altro interessante risultato ottenuto dagli stessi Autori è quello relativo all'assenza della rottura dello stigma quando il follicolo preovulatorio viene isolato dall'ovaia prima della scarica di gonadotropine endogene, dimostrando che il follicolo costituisce un'entità indipendente a partire da un'ora post-coito. Quattro, cinque ore dopo il coito, i livelli di LH ritornano sui valori basali, mentre 16-22 ore dopo si osserva un nuovo picco di FSH che stimola la formazione di una nuova popolazione di follicoli ovarici che si svilupperanno fino allo stadio antrale, esplicando una funzione luteotrofa fondamentale, mediata dall'17-β estradiolo, nei confronti dei corpi lutei, già a partire dalla quinta o sesta giornata dall'ovulazione.

Oltre a questi meccanismi, nella coniglia sono stati studiati e chiariti anche casi di ovulazioni spontanee in femmine non accoppiate (Walton e Hammond 1928; Parkes, 1934), che hanno fatto ipotizzare l'esistenza di altri fattori di induzione dell'ovulazione. Infatti Carlyle e Williams (1961) sono riusciti a indurre l'ovulazione in una piccola percentuale di femmine a seguito di stimolazioni meccaniche, mentre Viudez-de-Castro *et al.* (2007) hanno osservato che il 32,5% di coniglie ovulava senza alcun tipo di trattamento ormonale. In quest'ultimo caso i risultati positivi sono da imputare esclusivamente alla stimolazione prodotta dalla pipetta di inseminazione. Hammond e Asdell (1927) hanno ottenuto il 3-6% di fertilità in inseminazioni senza contatto con il maschio, mentre tale parametro raggiungeva il 33% quando l'inseminazione era accompagnata da un accoppiamento rifiutato. Se invece una coniglia recettiva veniva inseminata artificialmente e successivamente accoppiata con un maschio sterile, la fertilità raggiungeva il 90%. Il basso tasso di concepimento ottenuto nei primi due gruppi era chiaramente associato alla mancanza di induzione dell'ovulazione. Sawyer e Markee (1959) stimolando la vagina con una bacchetta di vetro hanno osservato percentuali di ovulazione del 45% in coniglie recettive e del 40% in coniglie non recettive. Al contrario, Thielate *et al.* (1931) non osservarono alcun effetto significativo in relazione ad un'anestesia locale a livello di vagina sul riflesso copulatorio e sull'ovulazione.

Hammond e Marshall (1925) in coniglie allevate in colonia, hanno riscontrato delle monte tra coniglie gravide, senza alcun pregiudizio per la gravidanza stessa. Successivamente, Stormshak e Casida (1964) hanno osservato che un trattamento a base di LH e di gonadotropina corionica umana (hCG, human Corionic Gonadotropin) induceva l'ovulazione in coniglie gravide da 9 giorni seguita peraltro da aborto. Quando però l'hCG veniva iniettato prima del quarto giorno, la conseguente ovulazione non era accompagnata da insufficienza luteale e due generazioni di corpi lutei di età diverse convivevano a livello ovarico, dimostrando l'effetto diretto delle gonadotropine sul corpo luteo. Per giustificare l'aborto, Keyes e Nalbandov (1967) hanno ipotizzato che l'LH stimolasse l'ovulazione dei follicoli più maturi, con arresto dell'azione luteotropica, successiva regressione dei corpi lutei e conseguente interruzione della gravidanza.

Dopo questa carrellata, una citazione va fatta ad un interessante lavoro di un gruppo di ricerca svedese (Dahm-Kähler *et al.*, 2006) che ha messo a punto un metodo per l'osservazione *in vivo* ed in tempo reale dell'ovulazione della coniglia, grazie all'utilizzo di una camera organi (Figura 1). L'interesse verso questo studio è legato alle grandi opportunità che tale metodica potrebbe offrire per lo studio dei meccanismi ovulatori, specie se combinata con variabili ematiche e follicolari.

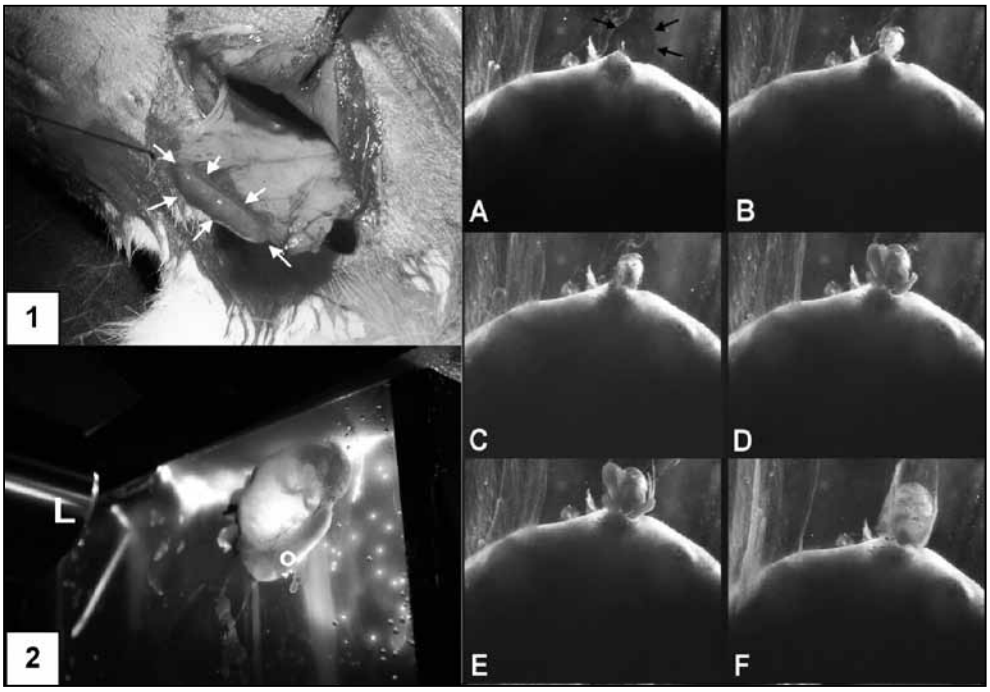

Figura 1 – Espianto dell'ovaia (1) e posizionamento in camera organi (2) per osservazione al microscopio (L). Rottura del follicolo in differenti momenti (A, 0; B, 5; C, 10; D, 55; E, 65; F, 545 secondi). Il primo segno di rottura del follicolo è la perdita di liquor follicoli (A). Poi si verifica l'estrusione delle cellule della granulosa (B) che successivamente è accompagnata da perdita di sangue (C-F) (Dahm-Kähler et al., 2006; su concessione di Oxford Journals, Licenza Numero: 2604170996980).

GnRH ANALOGHI: AGONISTI E ANTAGONISTI

A seconda dell'origine, gli ormoni GnRH simili possono essere ascritti in due gruppi: GnRH naturale e analoghi sintetici del GnRH. Tra questi esiste un analogo del GnRH naturale (Gonadorelina) e analoghi del GnRH sintetico, spesso chiamati Superanaloghi. Infatti, negli ultimi anni, la tecnologia di sintesi di polipetedi in fase solida ha permesso di produrre una enorme quantità di analoghi del GnRH (circa 2000; Karten and River, 1986) variabili per l'affinità dei recettori, l'assorbimento *in vivo*, la resistenza alla degradazione e le modalità di eliminazione. Recentemente, nella pratica clinica, sono stati introdotti gli antagonisti del GnRH che hanno un meccanismo d'azione completamente differente rispetto agli agonisti (Figura 2).

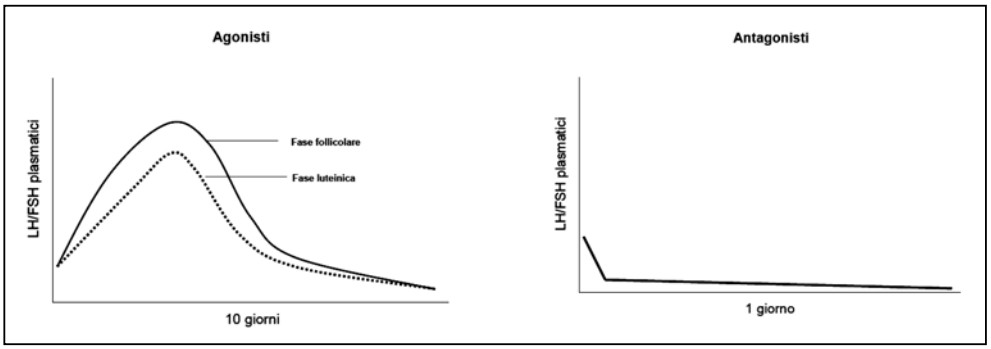

Figura 2 – Effetto degli analoghi del GnRH sulla secrezione di gonadotropine da parte dell'ipofisi (Hodgen, 1990, modificato).

Infatti, mentre gli agonisti del GnRH, dopo un iniziale effetto di stimolazione ipofisaria inducono una desensibilizzazione delle cellule gonadotropiniche e una riduzione del numero di recettori per il GnRH sulla membrana cellulare, gli antagonisti producono un immediato effetto bloccando in modo competitivo i recettori del GnRH. Con questo meccanismo d'azione, gli antagonisti inducono una soppressione acuta e rapida dell'LH senza neanche un iniziale incremento dello stesso. La struttura primaria del GnRH dei mammiferi è riportata in Tabella 1. Una caratteristica fondamentale degli agonisti è la sostituzione degli L-isomeri con i D-isomeri. I più diffusi agonisti sintetici del GnRH diffusi in commercio sono: la Buserelina, la Leuprorelina, la Goserelina e la Triptorelina e, tranne quest'ultima, sono impiegati come acetati. In generale sono sensibili alle peptidasi e quindi alla degradazione gastrointestinale, rendendo sconsigliabile la somministrazione orale (Conn e Crowley, 1991; Chrisp e Goa, 1990). Alcuni studi hanno però dimostrato che dei frammenti di GnRH possono conservare la loro efficacia biologica ed essere assorbiti a livello intestinale (Stetler-Stevenson *et al.*, 1981; Griffith e McDermott, 1984; Roberts *et al.*, 1999). Altri Autori hanno riscontrato una minore degradabilità intestinale degli analoghi rispetto al GnRH naturale (Berger *et al.*, 1991), la presenza di recettori nella mucosa gastrica a livello di cellule epiteliali (Gama e Alvarez, 2001) e di duodeno (Isakenkov *et al.*, 1979). Brussow *et al.* (2007) hanno ottenuto un'induzione della secrezione di LH in maiali nani a seguito di una somministrazione enterale di 10 mg di D-Phe6-LHRH. Bassol *et al.* (1997), somministrando 35 µg di Buserelina (Suprefact) per via orale a bambini di età compresa tra 2 e 4 mesi, hanno notato un picco di LH nelle urine 4-6 ore dopo il trattamento, confermando che una significativa quota di GnRH analogo somministrato per via orale sfugge alla degradazione gastrointestinale ed incrementa significativamente la produzione di LH rispetto al controllo. La somministrazione intra-nasale è relativamente inefficiente e fornisce risultati variabili, con solo un 20% circa di analogo disponibile rispetto al trattamento intramuscolare o sottocutaneo (Chrisp e Goa, 1990; Gudmundsson *et al.*, 1984). L'assorbimento vaginale è stato studiato per la prima volta nei ratti osservando un 20% di biodisponibilità in combinazione con acidi organici (Okada *et al.*, 1982).

TRATTAMENTI PER VIA PARENTERALE

La tecnica standard di IA in coniglicoltura prevede la somministrazione intramuscolare di GnRH analoghi al fine di indurre l'ovulazione grazie al rilascio di LH dall'ipofisi (Rodríguez *et al.*, 1988; Rebollar *et al.*, 1997). La capacità dell'LH di indurre l'ovulazione, specificatamente nel coniglio, fu evidenziata per la prima volta da Pincus nel 1940 e poi da Parkes nel 1943. Solo negli anni sessanta però, alcuni ricercatori hanno iniziato ad identificare dei meccanismi ormonali orientati alla definizione di protocolli operativi per l'IA del coniglio (Harper, 1961; Adams, 1961; Foote *et al.*, 1963). Riguardo al GnRH, inizialmente alcuni ricercatori (Foxcroft *et al.*, 1975) ne hanno testato l'efficacia a diversi dosaggi (1, 5, 10 o 20 µg) somministrandolo per via endovenosa; gli stessi riscontarono un tasso di ovulazione significativamente più elevato al dosaggio 10 µg, legato anche alle ridotte concentrazioni di progesterone plasmatico riscontrato nelle coniglie di questo gruppo. Hulot *et al.* (1988) hanno anche dimostrato l'efficacia dell'hCG nell'induzione dell'ovulazione in diversi genotipi di conigli; infatti, sia il genotipo A1066 (origine Californiana) che quello A1077 (origine Nuova Zelanda) rispondevano positivamente al trattamento intramuscolare con 10 UI di hCG, mostrando tassi di ovulazione simili a quelli di coniglie accoppiate naturalmente. Gli stessi Autori hanno riscontrato un effetto positivo di tale trattamento anche su coniglie non recettive, che non mostravano un atteggiamento di lordosi, indispensabile, come noto, alla riuscita dell'accoppiamento nel caso di monta naturale. Theau-Clement *et al.* (1990) hanno confrontato l'efficacia di due GnRH analoghi, 0,8 µg di Buserelina (Receptal) e 20 µg di Gonadorelina (Fertagyl) somministrati per via intramuscolare immediatamente prima della IA, su coniglie recettive e non. Nelle prime il tasso di ovulazione, è stato del 72,5 e dell'87,9% rispettivamente con Fertagyl e con Receptal. Nelle coniglie non recettive, invece, gli Autori non hanno riscontrato differenze neppure a livello di fertilità. Al contrario, il numero di nati vivi è stato superiore nelle coniglie in lattazione trattate con Fertagyl. Nel complesso, comunque, il numero di svezzati totali è stato pressoché identico nei due gruppi, a conferma dei risultati conseguiti da precedenti Autori (Battaglini, 1986; Lammers e Petersen, 1987; Rodriguez e Ubilla, 1988).

In generale, le azioni farmacologiche dell'hCG e dell'LH possono considerarsi simili, sebbene la farmacocinetica e la biodisponibilità di questi ormoni siano diverse; infatti l'emivita dell'LH risulta inferiore rispetto a quella dell'hCG, tanto da giustificare i vantaggi osservati con il trattamento LH (Simmon *et al.*, 1988). L'azione dell'LH nel follicolo è maggiormente selettiva e richiede un minor tempo per la deiscenza, oltre che garantire una qualità superiore di oociti e di embrioni, legata a buoni livelli di secrezione di estradiolo e progesterone durante il periodo post-ovulatorio.

Tabella 1 – Alcuni analoghi del GnRH.

Nome	Potenza relativa	Nome comm.	Sequenza aminoacidica									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GnRH Gonadorelina	1	Fertagyl®	Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gli	Leu	Arg	Pro	Gly-NH_2
Lecirelina		Dalmarelin®	Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	D-tertLeu	Leu	Arg-	Pro-NHEt	
Leuproride	15	Lucrin Depot®	Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Leu	Leu	Arg	Pro	N-$EtNH_2$
Buserelina	20	Receptal	Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Ser	Leu	Arg	Pro	N-$EtNH_2$
Nafarelina	150	Synarel®	Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Nal	Leu	Arg	Pro	N-$EtNH_2$
Deslorelina	150	Ovuplant®	Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Trp	Leu	Arg	Pro	N-$EtNH_2$
Istrelina	150		Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Ists	Leu	Arg	Pro	N-$EtNH_2$
Goserelina	100	Zoladex®	Pyr-glu	His	Trp	Ser	Tyr	D-Ser	Leu	Arg	Pro	N-$EtNH_2$
Cetrorelix	Antagonista		Ac-D-Nal	D -Cpa	D-Pal	Ser	Tyr	D-Cit	Leu	Arg	Pro	AzGly-NH_2
Ganirelix	Antagonista		Ac-D-Nal	D -Cpa	D-Pal	D-hArg	----------		Leu	hArg	Pro	D-Ala-H_2

Rodriguez e Ubilla (1988), somministrando 20 o 40 µg (via intramuscolare) di GnRH analogo (Fertagyl, Intervet) a coniglie recettive o non, osservarono che le dosi superiori riuscivano solo parzialmente ad aumentare il tasso di ovulazione, ipotizzando un limite di sensibilità dell'ipofisi superiore al minimo dosaggio e che ciò potrebbe essere condizionato dai livelli di estrogeni presenti in circolo e quindi dal numero di follicoli pre-ovulatori. Molina *et al.* (1991), hanno confrontato l'efficacia di 50 UI di LH puro e 50 UI di hCG su coniglie nullipare, valutando la secrezione di 17/β-estradiolo e di progesterone e la qualità di oociti ed embrioni. Il numero di follicoli e di oociti recuperati sono stati ridotti dal trattamento con LH, anche se la percentuale di metafase II e oociti degenerati erano simili con i due trattamenti. Le concentrazioni di estradiolo e progesterone sono risultate più elevate nel gruppo LH e ciò potrebbe indicare un certo grado di iperstimolazione ovarica e giustificare il miglioramento del rapporto estradiolo/progesterone. Al momento dell'ovulazione si verifica una serie di eventi endocrini che culminano con la riduzione dei livelli di estradiolo in circolo e l'aumento di quelli di progesterone, che sono di solito associati al tasso di ovulazione e svolgono un importante ruolo sulla qualità degli oociti e degli embrioni. Infatti altri studi hanno evidenziato che il picco di LH determina un rapido aumento delle concentrazione di progesterone, androgeni e estradiolo, che iniziano a ridursi circa 2 ore dopo il picco stesso fino a divenire non rilevabili al momento dell'ovulazione (LeMaire *et al.*, 1979; Janson *et al.*, 1982). Holmes *et al.* (1985) osservarono che la produzione di progesterone che normalmente la coniglia mette in atto al momento del picco dell'LH non è indispensabile per il processo ovulatorio se non a livelli molto elevati. In uno studio volto a chiarire gli effetti dell'analogo Leuprolide acetato (20 µg/kg) sull'ovulazione e sulla steroidogenesi della coniglia (Zanagnolo *et al.*, 1996) è stato osservato che a dosi farmacologiche l'analogo in esame può esercitare effetti negativi sulla funzionalità dell'oocita sia attraverso un'azione diretta sulla stesso (stato di pre-impianto e degenerazione) che una indiretta sull'ambiente intrafollicolare.
Più recentemente Mehaisen *et al.* (2005) hanno confrontato l'efficacia di due trattamenti a base di Buserelin acetato (Hoechst, S.A.; 2 µg, intramuscolare) e di hCG (Coriogan, Ovejero; 75 UI, intravenoso). Quest'ultimo trattamento ha aumentato in misura significativa il tasso di ovulazione rispetto all'analogo del GnRH (17.3 vs 13.8%). Il numero di follicoli emorragici (5,5 vs 8,8), il tasso di recupero degli embrioni (48,7 vs 34,8%), la percentuale di fattrici con almeno un embrione normale (80,4 vs 68,4) e il numero di embrioni normali per fattrice (7,5 vs 6,9) sono stati migliori nel gruppo hCG. Tali risultati confermano quelli ottenuti in precedenti studi condotti da Garcia-Ximenez and Vicente (1992) e Viudez de Castro *et al.* (1995).
Zapletal e Pavlik (2008) hanno studiato gli effetti di differenti dosaggi di lecirelina (0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 4,0 µg/fattrice) su coniglie sia nullipare che in lattazione. Nelle nullipare la fertilità ha presentato un range di variabilità dal 10,0% (0,05 µg) a 89,5% (1,5 µg); nelle multipare il valore più basso è stato riscontrato con la dose di 0,05 µg e a partire da 0,3 µg i valori sono aumentati. Il minor numero di nati vivi (6,64) nelle nullipare è stato ottenuto con la dose di 0,1 µg e a partire da 0,3 µg è migliorato in misura significativa (8,28). Nelle multipare il più basso numero di nati vivi si è osservato nel gruppo 0,05 µg ed il più alto (10,73) alla dose di 4,0 µg.

TRATTEMENTI PER VIA INTRAVAGINALE

Come già accennato, recentemente sono stati effettuati degli studi volti a valutare l'efficacia di una somministrazione intravaginale, inclusa nella dose inseminante, di diversi GnRH analoghi. Ciò al fine di eliminare un'iniezione alla fattrice e di ridurre la possibilità di errori in allevamento, dal momento che in questo caso, le dosi inseminanti, complete di trattamento, sarebbero preparate dai centri di produzione del seme. Il primo studio sull'argomento è stato condotto da Quintela *et al.* (2004) che hanno sottoposto tre gruppi di coniglie (secondipare) ai seguenti trattamenti:

- Controllo 0,8 µg/capo di Buserelina (Receptal) per via intramuscolare;
- Gruppo 1: 8 µg/capo di Buserelina (Suprefact) per via intravaginale nella dose inseminante;
- Gruppo 2: 16 µg/capo di Buserelina (Suprefact) per via intravaginale nella dose inseminante.

La fertilità è stata influenzata dal trattamento ed in particolare solo nel gruppo 2 si sono raggiunti livelli simili al Controllo, mentre il dosaggio più basso ha ridotto significativamente la fertilità (55,6 vs 82,4 e 84,6% rispettivamente per Controllo e Gruppo 2). Al contrario prolificità e mortalità non sono state influenzate dal trattamento. Nei due gruppi sperimentali il picco di LH ematico (36.6 e 37.8 ng/mL) è stato raggiunto 60 minuti dopo l'IA, mentre nelle femmine del gruppo controllo tale picco (35,1 ng/mL) è stato rilevato 90 minuti dopo l'IA; dopo 150 minuti in tutti i gruppi i valori sono tornati al livello basale (da 3,4 a 4,9 ng/mL) osservato prima della somministrazione di Buserelina. Gli stessi Autori in una prova di campo, pur non avendo osservato differenze significative in termini di fertilità, hanno confermato quanto riscontrato in precedenza circa la correlazione positiva tra performance riproduttive e dose di Buserelina utilizzata. Operando in tal modo, sono riusciti a dimostrare la possibilità di un uso di GnRH analoghi per via intravaginale purché a dosaggi almeno 15 volte superiori a quelli utilizzati nei trattamenti intramuscolari.

Il dato più interessante emerso dalla sperimentazione è quello relativo al picco dell'LH che nei gruppi sperimentali è stato raggiunto più rapidamente, ad indicare una probabile maggiore velocità di assorbimento dell'ormone attraverso la via mucosale. Tale situazione potrebbe anche essere legata al fatto che gli alti livelli di estrogeni presenti durante l'estro, aumentano la vascolarizzazione del tratto genitale incrementando la permeabilità dei capillari (Hafez, 1993) e facilitando così l'assorbimento di varie sostanze attraverso le mucose. Il fatto che non sia stata riscontrata una maggiore efficacia è probabilmente da collegarsi ad una frazione dell'ormone che viene dispersa e/o non assorbita. Potrebbero aver influenzato la risposta anche altri fattori legati per esempio ad alcuni costituenti del plasma seminale, come le prostaglandine, o a particolari situazioni dell'apparato riproduttore che possono modulare l'assorbimento dell'ormone e che saranno oggetto della relazione seguente in questo Convegno. Gli stessi Autori in successive sperimentazioni (Quintela *et al.*, 2008; 2009), sia in stabulario che in campo, hanno confrontato l'efficacia di un trattamento intramuscolare con 20 µg/coniglia di gonadorelina (Inducel GnRH: 20 µg/ml) e di una somministrazione intravaginale di 25 µg di [des-Gly10, D-Ala6]–LHRH etilamide (L-4513, Sigma, St. Louis, MO, USA). Tale analogo avrebbe una potenza inferiore alla

Buserelina (0,7 volte) ma sarebbe 14 volte più potente della Gonadorelina (Conn e Crowley, 1991). I risultati relativi alla fertilità hanno confermato queste asserzioni, specialmente nella prova di campo, ove il trattamento intravaginale ha permesso di ottenere livelli significativamente superiori (91,1 vs 85,6%; P<0,05). Un altro aspetto interessante è il mantenimento dell'efficacia anche dopo trattamenti ripetuti. Infine, circa la tempistica di aggiunta dell'analogo alla dose inseminante, si è osservata una stabilità di azione fino a 24 ore prima della IA; invece, aggiungendo l'ormone 32 ore prima, la fertilità si è ridotta in maniera significativa. Quindi, anche i risultati di tali studi hanno dimostrato che l'agonista GnRH [des-Gly10, D-Ala6] - LHRH etilamide, veicolato in dose seminale, può essere utilizzato con successo per indurre l'ovulazione in coniglie nullipare o pluripare in lattazione.
In un altro studio, Ondruška *et al.* (2008) hanno verificato l'efficacia di un trattamento intravaginale del superanalogo GnRH-Lecilerum (Supergestran) a diversi dosaggi: 2,5, 5, 7,5 e 15 µg/dose, confrontata con quella di un trattamento intramuscolare (2,5 µg/coniglia). Il più basso valore del tasso di fertilità (42,99%) è stato ottenuto nel gruppo S2,5 ed il più elevato in quello S7,5 (72,09%), superiore del 9,35% rispetto al controllo. Il numero medio di nati vivi e la mortalità non hanno mostrato differenze significative tra i gruppi.
Viudez-de-Castro *et al.* (2007) hanno proseguito in questa serie di studi, aggiungendo alla dose inseminante due analoghi del GnRH, la Buserelina e la Triptorelina.
In questo caso i gruppi a confronto erano:
- Controllo negativo (femmine inseminate 0.5 mL di seme diluito senza aggiunta di analoghi);
- Controllo positivo (femmine inseminate 0.5 mL di seme diluito senza aggiunta di analoghi e trattate con 1 µg di Buserelina acetato (Suprefact, Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid, Spain) per via intramuscolare;
- Gruppo Buserelina 4 (femmine inseminate 0.5 mL di seme diluito con aggiunta di 4 µg/mL di Buserelina);
- Gruppo Buserelina10 (femmine inseminate 0.5 mL di seme diluito con aggiunta di 10 µg/mL di Buserelina, Spanish patent registered number ES2190723B1).
- Gruppo Triptorelina 4 (femmine inseminate 0.5 mL di seme diluito con aggiunta di 4 µg/mL di Triptorelina, Decapeptyl, Ipsen-Pharma, Barcellona, Spagna);
- Gruppo Triptorelina 10 (femmine inseminate 0.5 mL di seme diluito con aggiunta di 10 µg/mL di Triptorelina, Decapeptyl, Ipsen-Pharma, Barcellona, Spagna).

Solo le coniglie del gruppo Buserelina 10 hanno raggiunto percentuali di ovulazione simili a quelle del Controllo positivo (88,9 vs 97,8%), mentre in tutti gli altri gruppi i livelli di questo parametro sono stati significativamente più bassi.
Per ciò che concerne la fertilità, l'aggiunta dei due analoghi ai più alti dosaggi ha permesso di eguagliare i risultati ottenuti nel gruppo Controllo (79,5 vs 79,5 e 74,4, rispettivamente per Controllo, Buseleina10 e Triptorelina10).
In un altro studio, i medesimi Autori (Vicente *et al.*, 2007), utilizzando tre diversi genotipi e diverse condizioni di allevamento, hanno riscontrato una minor efficacia del trattamento intravaginale con Buserelina (10 µg/mL dose) in termini di fertilità e di percentuali di parti (+ 7,1% e +7,4% rispettivamente nel gruppo Controllo; P<0,05), anche se poi i gruppi non hanno mostrato differenze a livello di numerosità della nidiata e mortalità.

CONCLUSIONI

In sintesi, da questa ricerca bibliografica si può dedurre che l'efficacia della somministrazione di GnRH analoghi per via intravaginale può considerarsi soddisfacente solo utilizzando dosaggi molto superiori rispetto a quelli utilizzati nel trattamento intramuscolare. Ciò dipende evidentemente dalla ridotta capacità di assorbimento degli analoghi da parte della mucosa vaginale (circa il 20% del totale; Okada *et al.*, 1982). Come verrà approfondito nella relazione successiva, è evidente che l'assorbimento del GnRH a livello vaginale è probabilmente influenzato in diversa misura dallo stato delle mucose e dalle già citate secrezioni legate alle condizioni di recettività, dalla presenza di acidi organici nel mestruo diluitore, dalla concentrazione spermatica (gli spermatozoi presentano una grande capacità di incorporare molecole estranee come frammenti di DNA), dalla presenza del plasma seminale e da eventuali stati infiammatori. In questo scenario, a fronte degli indubbi vantaggi in termini di benessere animale e di organizzazione del lavoro in allevamento, l'individuazione dell'analogo più efficace che possa essere utilizzato a dosaggi economicamente sostenibili rappresenta una delle sfide più importanti della coniglicoltura attuale.

BIBLIOGRAFIA

Adams, C.E., 1961. Artificial insemination in the rabbit. J. Repr. Fert. 2:521-528.

Battaglini, M., Costantini, F., Baldissera, C.N., Castrovilli, C.F., 1982. Induction of ovulation and artificial insemination in the rabbit. Riv. Coniglicoltura 19:45-54.

Berger, H., Heinrich, N., Albrecht, E., Kertscher, U., Oehlke, J., Bienert, M., Schafe, H., Baeger, I., Mehlis, B., 1991. Gonadotropin-releasing hormone analogs: relationship between their dtructure, proteolytic inactivation and pharmacokinetics in rats. Regul. Pept. 33:299-311.

Bassol, S., Barraza-Vasquez, A., Nava, M.P., Recio, R., 1997. Effects of oral buserelin on urinary LH secretion in male infants. Contraception 55:311-314.

Bellerby, C.W., 1933. The relation of the anterior lobe of the pituitary to ovulation in the rabbit. Exp. Physiol. 123-132.

Biggers, J.D., 1991. Walter Heape, FRS: a pioneer in reproductive biology. Centenary of his embryo transfer experiments. J. Repr. Fert. 93:176-186.

Brüssow, J.K., Kanitz, E., Tuchscherer, A., Tosch, P., 2007. Study of enteral versus parenteral application of the Gonadotropin Releasing Hormone agonist Gonadorelin[6-D-Phe] (D-Phe6-LHRH) on LH secretion in goettinger miniature pigs. J. Repr. Dev. 3:699-706.

Buttnerw, D., Wienertk, F., 1935. Dauerbrunst und Follikelpersistenz. (Experimentelle Untersuchungen an Kaninchen.). Arch. Gynaek. 159:64-83.

Camier, B., Gagneur, O., Arlot, S., Thépot, F., Vitse, M., 1989. Preliminary study of the use of intranasal Buserelin in the long-term protocol of ovarian stimulation with the view toward fertilization in vitro. Rev. Fr. Gynecol. Obstet. 84:659-661.

Carlyle, A., Williams, T.D., 1961. Artificially induced ovulation in the rabbit. J. Physiol. Lond. 157:42-54.

Conn, P.M., Crowley, W.F., 1991. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. N. Engl. J. Med. 324:93-103.

Chrisp, P., Goa, K.L., 1990. Nafarelin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and clinical potential in sex hormone-related conditions. Drugs 39:523-551.

Dahm-Kähler, P., Ryota Fujii, L., Axelsson, A., Janson, O., Brännström, M. 2006. An intravital microscopy method permitting continuous long-term observations of ovulation *in vivo* in the rabbit. Hum. Repr. 3:624-631.

Donnez, J., Nisolle-Pochet, M., Cleckx-Braun, F., Sandow, J., Casanas-Roux, F., 1989. Administration of nasal Buserelin as compared with subcutaneous Buserelin implant for endometriosis. Fertil. Steril. 52:27-30.

Foote, R.H., Hafs, H.D., Staples, R.E., Gregoire, A.T., Bratton, R.W., 1963. Ovulation rates and litter sizes in sexually receptive and nonreceptive artificially inseminated rabbits given varying dosages of luteinizing hormone. J. Repr. Fertil. 5:59-66.

Foxcroft, G.R., Hamilton, J.W., Nalbandov A., 1975. Ovulation and luteal function in the rabbit in response to injection or infusion of synthetic Gonadotropin-Releasing Hormone (Gn-RH). Biol. Repr. 12:284-288.

Gama, P., Alvares, E.P., 2001. Localization of luteinizing-hormone releasing hormone binding sites in the gastric mucosa of suckling rats. Anat. Rec. 264:43-50.

García-Ximénez, F., Vicente, J.S., 1992. Effect of ovarian cystic or haemorragic follicles on embryo recovery and survival after transfer in hCG-ovulated rabbits. Repr. Nutr. Dev. 32:143-149.

Griffith, E.C., McDermott, J.R., 1984. Biotransformation of neuropeptides. Neuroendocrinology 39:573-581.

Gudmundsson, J.A., Nillius, S.J., Bergquist, C., 1984. Inhibition of ovulation by intranasal nafarelin, a new superactive agonist of GnRH. Contraception 30:107-114.

Guttmacher, M.A, Guttmacher, F.A., 1921. Induction of ovulation in human ovaries perfused in vitro. Johns Hopkins Hops. Bull. 32:394-402.

Hafez, E.S.E., 1993. Reproducción, hormonas y factores de crecimiento. In: E.S.E. Hafez (ed) Reproducción e inseminación artificial en animales, 6th edition.: Interamericana-McGraw-Hill, DF, Mexico.

Hammond, J., Asdell, S.A., 1927. The vitality of the spermatozoa in the male and female reproductive tracts. Brit. J. Exp. Biol. 4:155-174.

Hammond, J., Marshall, F.H.A., 1925. Reproduction in the rabbit. Oliver & Boyd, Edinburgh, UK.

Harper, J.K., 1961. The time of ovulation in the rabbit following the injection of luteinizing hormone. J. Endocrin. 22:147-159.

Heape, W., 1905. Ovulation and degeneration of ova in the rabbit. Proc. R. Soc. Lond., Biol. Sci. 76:260-268.

Hill, R.T., Parkes, A.S., White, W.E., 1934. The assay of the ovulation-producing substance. J. Physiol. 81:335-360.

Holmes, P.V., Sogn, J., Schillinger, E., Janson, P.O., 1985. Effects of high and low preovulatory concentrations of progesterone on ovulation from the isolated perfused rabbit ovary. J. Repr. Fert. 75:393-399.

Hulot, F., Mariana, J.C., Cattiau G., 1988. HCG-induced ovulation in two rabbit breeds: Effects of dose, season and sexual behaviour. Livest. Prod. Sci. 20: 257-267.

Janson, P.O., LeMaire, W.J., Källfelt, B., Holmes, P.V., Cajander, S., Bjersing, L., Wiqvist, N., Ahrén, K., 1982. The study of ovulation in the isolated perfused rabbit ovary. I. Methodology and patterns of steroidogenesis. Biol. Reprod. 26:456-465.

Keyes, P.L., Nalbandov, A.V., 1967. Maintenance and function of corpora lutea in rabbits depend on estrogen. Endocrinology 80:938-945.

Lammers, H.J., Petersen, J. 1987. Einsatz eines luteolytischen Prostaglandins in der kaninchenfelich produktion. Dtsch. Tierarztl. Wschr. 94:410-412.

LeMaire, W.J., Clark, M.E., F.M., Marsh, 1979. Biochemical mechanisms of ovulation. In: E.S.E. Hafez (ed.) Human ovulation. Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam, pp. 159-175.

Lindner, H.R., Amsterdam, A., Salomon, Y., Tsafriri, A., Nimrod, A., Lamprecht, S.A., Zor, U., Koch, Y., 1977. Intraovarian factors in ovulation: determinants of follicular response to gonadotrophins. J. Repr. Fert. 51:215-235.

Mehaisen, G.M.K., Vicente, J.S.R., Lavara, R., Viudes-de-Castro, M.P., 2005. Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and in vitro development post-vitrification in two selected lines of rabbit does. Anim. Repr. Sci. 90:175-184.

Molina, I., Pla, M., Vicente, J.S., Martfn, A., Romeu, A., 1991. Induction of ovulation in rabbits with pure urinary luteinizing hormone and human chorionic gonadotrophin: comparison of oocyte and embryo quality. Hum. Repr. 6:1449-1452.

Ondruška, L., Parkányi, V., Rafay, J., Chlebec, I., 2008. Effect of LHRH analogue included in seminal dose on kindling rate and prolificacy of rabbits artificially inseminated. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 423-425.

Okada, H., Yamazaki, I., Ogawa,Y., Hirai, S.,Yashiki, M.T., Mima, H., 1982. Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone releasing hormone analogue (leuprolide) in rats. I. Absorption by various routes and absorption enhancement. J. Pharm. Sci. 71:1367-1371.

Okada, H., Yamazaki, I., Yashiki, T., Mima, H., 1983. Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone releasing hormone analogue (leuprolide) in rats. II. Mechanism of absorption enhancement with organic acids. J. Pharm. Sci. 72:75-78.

Isachenkov, V,A., Bakalkin, G.I., Tsibezov, V.V., 1979. Immunoreactive luliberin in the visceral organs of rats. Bull. Eksp. Biol. Med. 87:475-478.

Parkes, A.S., 1943. Induction of super-ovulation and super-fecundation in rabbits. J. Endocr. 3:268-279.

Pincus, G., 1940. Superovulation in rabbits. Anat. Rec. 77:1-14.

Quintela, L., Pena, A., Barrio, M., Vega, M.D., Dıaz, R., Maseda, F., Garcıa, P., 2001. Reproductive performance of multiparous rabbit lactating does: effect of lighting programs and PMSG use. Repr. Nutr. Dev. 41:247–257.

Quintela, L.A., Pena, A.I., Vega, M.D., Gullon, J., Prieto, M.C., Barrio, M., Becerra, J.J., Maseda, F., Herradon, P.G., 2004. Ovulation induction in rabbit does submitted to artificial insemination by adding buserelin to the seminal dose. Repr. Nutr. Dev. 44:1-10.

Quintela, L.A., Pena, A.I., Vega, M.D., Gullon, J., Prieto, M.C., Barrio, M., Becerra, J.J., Maseda, F., Herradon, P.G., 2008. Ovulation induction in rabbit does by intravaginal administration of [des-Gly 10, D-Ala6]-LHRH Ethylamide: field trial. In Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 427-430.

Quintela, L.A., Pena, A.I., Vega, M.D., Gullon, J., Prieto, M.C., Barrio, M., Becerra, J.J., Maseda, F., Herradon, P.G., 2009. Reproductive performance of rabbit does artificially inseminated via intravaginal administration of [des-Gly 10, D-Ala6]-LHRH Ethylamide as ovulation inductor. Repr. Dom. Anim. 44: 829-833.

Rebollar, P.G., Alvariño, J.M.R., Illera, J.C., Silván, G., 1997. Effect of gonadoreline and naloxone on induction of ovulation and plasma LH in rabbit. J. Physiol. Biochem. 53:205-210.

Roberts, P.R., Burney, J.D., Black, K.W., Zaloga, G.P., 1999. Effects of chain length on adsorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. Digestion 60:332-337.

Rodríguez, J.M., Ubilla, E., 1988. Effect of sexual receptivity on ovulation response in rabbit does induced with GnRH. In: Proc. 4th World Rabbit Congress, Budapest, Hungary, 504-509.

Sawyer, C.H., Markee, J.E. 1959. Estrogen facilitation of release of pituitary ovulating hormone in the rabbit in response to vaginal stimulation. Endocrinology 65:614-625.

Schochet, P. E., 1916. A suggestion as to the process of ovulation and ovarian cyst formation. Anat Rec. 10:477-485.

Shibata, S., 1931. The oestrous cycle and ovulation in the rabbit. J. Coll. Agric. Univ. Tokyo 11:309-320.

Stormshak, F., Casida, L.E., 1964. Effect of gonadotropins on corpora lutea of pseudopregnant rabbits. Endocrinology 75:321-332.

Simmon, J.A., Danfbrth D.R., Hutchinson, J.S., Hodgen, G.D., 1988. Characterization of recombinant DNA-derived human luteinizing hormone *in vitro* and *in vivo*: efficacy in ovulation induction and corpus luteum support. J. Am. Med. Assoc. 259:3290-3295.

Stetler-Stevenson, M.A., Yang, D.C., Lipkowski, A., McCartney, L., Peterson, D., Flouret, G., 1981. An approach to the elucidation of metabolic breakdown products of the luteinizing hormone-releasing hormone. J. Med. Chem. 24:688-692.

Testart, J., Thebault, B., Lefvre B., 1983. In-vitro ovulation of rabbit ovarian follicles isolated after the endogenous gonadotrophin surge. J. Repr. Fert. 68:413-418.

Theau-Clément, M., Bolet, G., Roustan, A., Mercier, P., 1990. Comparaison de différents modes d'induction de l'ovulation chez les lapines multipares en relation avec leur stade physiologique et la réceptivité au moment de la mise à la reproduction. In: Proc. 5emes Journ. Rech. Cunic., Paris, France, Vol. I, Communication 6.

Thebault, B., Lefvre B., Testart, J., 1983. Role of the extra-follicular compartment in the ovulation of isolated rabbit ovarian follicles. J. Repr. Fert. 68:419-424.

Thielate, A., Fee, R., Parkes, R., 1929. Studies on ovulation. III. Effect of vaginal aneesthesia on ovulation in the rabbit. J. Physiol. 70:612-621.

Vicente, J.S., Lavara, R., Lavara, F., Marco-Jimenez, F., Viudes-de-Castro, M.P., 2007. Rabbit reproductive performance after insemination with buserelin acetate extender. Livest. Sci. 115:153-157.

Viudes-de-Castro, M.P.; García-Ximénez, F.; Vicente, J.S., 1995. Embryo recovery from eliminating does of three selected rabbit strains for an embryo bank. Investigación Agraria: Prod. San. Anim. 145-152.

Viudes-de-Castro, M.P., Lavara, R., Marco-Jimenez, F., Cortell, C., Vicente, J.S., 2007. Ovulation induced by mucosa vaginal absorption of buserelin and triptorelin in rabbit. Theriogenology 68:1031-1036.

Walton, A., Hammond, J., 1928. Observations on ovulation in the rabbit. Br. J. Exp. Biol. 6:190-198.

Karten, M.J., Rivier, J.E., 1986. Gonadotropin-relasing Hormon analog design. Structure-function studies towards the development of agonists and antagonists: Rationale and perspective. Endocrinol. Rev. 7:44-56.

Zanagnolo, V., Dharmarajan, A.M., Hesla, J., Wallach, E.E., 1996. Effects of a gonadotropin-releasing hormone analog on rabbit ovarian function. Endocrinology 137:5400-5406.

Zapletal, D., Pavlik, A., 2008. The effect of lecirelin (GnRH) dosage on the reproductive performance of nulliparous and lactating rabbit does. Anim. Repr. Sci. 104: 306–315.

FACTORS AFFECTING EFFICACY OF INTRAVAGINAL ADMINISTRATION OF GnRH ANALOGUES FOR OVULATION INDUCTION IN RABBIT DOES

REBOLLAR P.G.

Department of Animal Production, Polytechnic University, Madrid, Spain
Pilar García Rebollar, Departamento de Producción Animal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid, Spain - Tel. +34 91 4524868 - Fax: +34 91 5499763
*Corresponding author: pilar.grebollar@upm.es

ABSTRACT

The vagina, unlike other mucoses, is very dynamic with respect to its histology and physiology. This leads to the existence of a long list of factors included in the vaginal environment that affect substances absorption deposited there. Recently, it has been obtained normal ovulation rates in rabbit does inseminated which were induced with an intravaginal dose of GnRH analogue. This text provides a review with information about the structure, tissues, secretions, contractions, and innervations of vagina of rabbit which can affect their absorption profile.

Key words: GnRH, Absorption, Vagina, Rabbit.

INTRODUCTION

Rabbit is an animal model useful for studying sperm distribution and function in the female. It is known the site of semen deposition with natural mating or artificial insemination, the seminal characteristics, the anatomy of the rabbit doe genital tract and the environment of the lumen. The most important interest in reproductive rabbit does has been limited to ovary, oviducts and uterine horns. The vagina has been only considered to be a part of the birth canal. However, the vagina is self-evidently involved in the sexual function. The new possibilities to include analogues of GnRH in the seminal doses are opening new pathways to study the absorption capacity of this reproductive channel.

GROSS ANATOMY AND VAGINAL BARRIER

The reproductive tract of the rabbit doe is bipartite from the ovary to the vagina. The vagina of New Zealand does is about 14-19 cm long. The urethral orifice opens into the vagina about 6 cm proximal from the introitus (Wingerd, 1984). Immediate-

ly proximal to this orifice there is a translucent crescent-shaped tissue that forms a "valve-like" structure named the urethrovaginal sphincter (Noyes *et al*., 1958)
The distal and proximal sections of vagina are named uretrovagina and cervicovagina, respectively. Each nongravid uterine horn is 13 to 14 cm long, and the complete oviduct (ampulla plus isthmus) is of similar length. The bipartite arrangement in rabbits prevents embryos from migrating from one uterus to the other, as can occur in species with a bicornuate uterus.
To decide whether the vaginal route is indeed an ideal way to deliver hormones (as GnRH analogues) into the rabbit body, it is necessary to know the physical and humoral barrier in which that peptide is located when is added in a seminal dose. Thus, it is important to know the vaginal histology composed of four distinct layers: epithelium, lamina propria, muscle and connective tissue (Figure 1).
The urovagina has a plane pluristratified epithelium and the thickness of the wall is high. By contrast, the cervicovagina posses a monostratified columnar epithelium with ciliated and nonciliated cells dense with microvilli (Barberini *et al*., 1991). Although it is usually considered to be a mucosa surface, it has no goblet cells with direct release of mucin. The inner vaginal lining does not form proper glands, but covered parietal infolding (Barberini *et al*., 1991). Post-coitally, the microvillous increase in the release of mucous containing secretory droplets that appear to contact both bundles of cilia and sperm heads, distributing these secretions over the sperm surface.

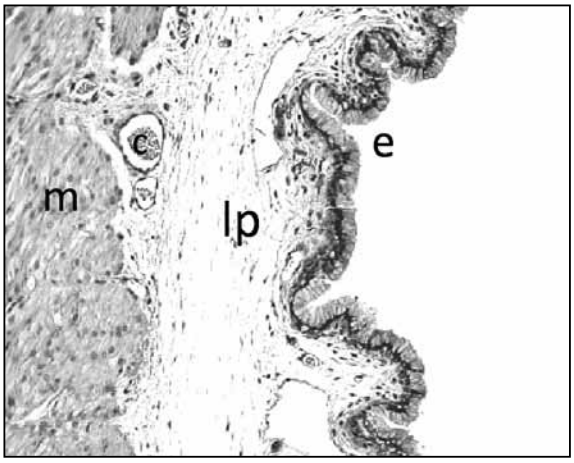

Figure 1 – Light microscope images of hematoxylin and eosin stained sections (x10) of the cervicovagina of rabbits. e: epithelium, lp: lamima propria, c: capilar, m: muscle. (Adapted from Dhondt et al., 2005)

The site of semen deposition in natural mating is related with the semen composition, biochemical constituents of seminal plasma and their direct effects on the female tract. Moreover, it defines the anatomical barriers that spermatozoa will encounter during transit to the oviducts. The rabbit male penis deposits semen in the urovagina, far from cervices, and the female tract then transports semen proximally to these initial barriers. These observations suggest that in natural mating only 5% of semen deposited in the urovagina is transported beyond the urovaginal valve (Overstreet and Cooper 1978). Instead, the insemination catheter deeply deposits diluted semen in the cervicovagina next to the bipartite cervix.
The rabbit vagina is a favourable environment for prolonged sperm survival. Soon after mating or insemination, sperm capable of fertilization are transported beyond the cervices leaving the seminal plasma behind (Drobniz and Overstreet, 1992). The vagina, cervix and uterus each maintain a population of progressively motile sper-

matozoa for at least 16 h after mating (Cooper *et al*., 1979), by which time ovulation occur and 98% of oocytes are fertilized. What happens to the rest of substances deposited in vagina?

VAGINAL ABSORPTION

Semen is a mixture of secretions susceptible of absorption and vaginal epithelium could be similar to intestinal epithelium in relation to their cells absorption capacity but it is not totally, due to some characteristics as morphology of epithelium, type of flora, immune response and pH. Before 1918, the vagina was considered to be an organ that was incapable of absorbing drugs. Then, Match (1918) reported the absorption of morphine, atropine, and potassium ion following vaginal administration. Nowadays, it is known that the vagina has a great potential for systemic delivery because of its large surface area, rich blood supply and permeability to a wide range of compounds, including peptides and proteins like GnRH analogues (Benziger and Edelson, 1983).
The substances included in an intravaginal dose can be absorbed: i) transcellularly via concentration dependent diffusion through cells, ii) paracellularly mediated by tight junctions and iii) vesicularly or receptor mediated transport (Richardson and Illum, 1992). Absorption of substances occurs in two main steps: substance dissolution in vaginal lumen and membrane penetration.
Any biological or formulation factor that affects these above steps could potentially change the absorption profile. A long list of factors exists in relation to:

- **Epithelium thickness**. Normally, the monostratified columnar and thin epithelium located in cervicovagina is more absorbent. Thus, as more deeply be deposited the seminal dose, the absorption rate must be better.
- **Volume, composition, pH and viscosity of vaginal mucus**. The volume, viscosity and pH of vaginal fluid have a considerable influence on vaginal drug absorption. In the case of estrous rabbit doe, mucus is present in scant amounts (Blandau, 1973). Low volume favors absorption of highly water-soluble peptides moreover, it could be avoided dislodging of the GnRH analogue from the vaginal cavity.
  The rabbit vagina has a mild pH (7-8) through its entire length. Vaginal mucus pH can modify the degree of ionization of weak electrolytes included in a seminal dose or from vaginal drug delivery systems, affecting their absorption (Hwang *et al*., 1977). Okada *et al*. (1983) suggest that the acidifying and chelating abilities of the acids may result in a potent enhancement of the vaginal absorption of the analogue leuprolide in rats. There was an increased absorption of the analogue by lowering the pH of the solution and increased more by adding citric, succinic, tartaric, and malonic acids.
- **Vaginal flora**. Unlike other animal species which are known to support an important genital tract mucosal microflora, few bacteria have been isolated from rabbit genital tract mucosal surfaces. The predominant constituents of the rabbit vaginal and cervical microflora are coagulase-negative staphylococci, micrococci, and non-fermentative bacilli (mainly pseudomonas). Another notable characteristic in rabbit vaginal flora includes the almost complete absence of lactobacilli may be due to its neutral pH values (Jacques *et al*., 1986). Rabbits do not have cyclic reproduc-

tive stages. Therefore, it is suspect that the vaginal environment in precoital rabbits is comparable to that during diestrus or anestrus in mice, rats, hamsters, and dogs (Noguchi *et al*., 2003) and nothing is known about interactions of the normal non pathogen flora with GnRH analogues.

- **Vaginal vascularization**. The second layer under epithelium is the lamina propria, or tunica, made of collagen and elastin, which contains a rich supply of vascular and lymphatic channels mainly in the urovagina (Oh *et al*., 2003). Secretions from the vaginal wall are transudate in nature and are produced by the engorgement of the vascular plexus that encompasses the vagina. Vaginal secretions help to protect the vagina against of infections.

Because the extensive vascular connections between the vagina and uterus, a first uterine pass effect has been hypothesized when hormones are administered vaginally (De Ziegler *et al*., 1997). In turn, the rabbit ovary has a dual blood supply: ovarian and uterine arteries. The ovarian bifurcation of the uterine artery creates utero-branch, which supplies the tip of the uterine horns, the oviduct and also forms anastomosis with a primary branch of the ovarian artery. Any disturbance in this communication, like a bilateral uterine ligation, causes significant hypo ovulation by increasing follicular atresia and impairs hormonal balance (Razi *et al*., 2010). Thus, there is a link between vagina-uterus and ovary by this important vascular junction that could be involved in the systemic absorption of GnRH analogues or other substances with direct action in the ovary. Quintela *et al*. (2004) observed a serum LH peak after intravaginal administration of buserelin, showing a pituitary response to GnRH absorbed from muscular tissue or from vaginal mucosa, respectively. These results have been confirmed in recent experiments (Figure 2; groups MB and VB; Rebollar P.G, data unpublished).

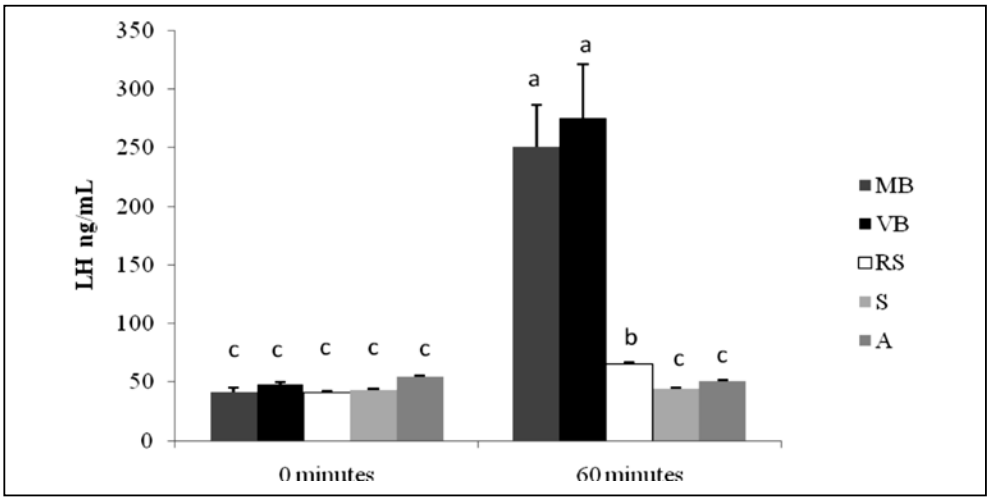

Figure 2 – Plasma LH concentrations of does (mean ± s.e.m; ng/ml) before (0) and after (60') treatments. MB: i.m. injection of 1 µg buserelin per doe; VB: buserelin added to extender (10 µg/0.5 ml per doe); RS: using a pool of undiluted semen obtained from 8 males (0.5 ml/doe) and i.m. saline; S: inseminated using 0.5 ml of saline and i.m. saline; A: received lumbar anaesthesia and only the empty glass catheter was introduced in the vagina and i.m. saline (a, b, c: P < 0.05).

In addition, some experiments conducted in other ovulation-induced species by depositing only homologous undiluted semen into the reproductive tract, produced ovulatory responses in a relevant percentage of females (87.5% in camels; Chen *et al.*, 1985; Xu *et al.*, 1985; Pan *et al.*, 1992), suggesting the presence of some factors in the semen that contributes to this response. No mention is made regarding uterine manipulations in previous studies in these species and it is unclear if semen was deposited in the vagina, the cervix, or the uterus. The results of recent studies in llamas and alpacas provide support for the hypothesis that a chemical substance in the semen which is intramuscularly injected, is responsible, in whole or in part, for inducing ovulation (Adams, 2005). In pigs, boar seminal plasma deposited near to uterus-tubal junction of the uterine horn in gilts advanced ovulation in the ovary ipsilateral to the side of deposition but no effect was found when it was deposited in the middle of the uterine horn between two ligatures (Wabersky *et al.*, 1999). No information about pituitary response was reported.
We have tested the pituitary response to the sole deposition of undiluted semen in the vagina of rabbit does. Our observations show a significant increase of serum LH (Figure 2) compared to groups inseminated only with saline (group S) or anesthetized rabbit does (group A; Rebollar P.G., data unpublished). Consequently, the possible existence in rabbit semen of some kind of molecule that can be absorbed, transported by the bloodstream to pituitary and leading to this increase in serum LH can be suggested. Paolicchi *et al.* (1999) suggested that some factor(s) in the seminal plasma of alpacas could contribute to some extent to the secretion of LH and, consequently to the induction of ovulation in receptive females of this species. Recently, Ratto *et al.* (2010) have concluded that ovulation-inducing factor (OIF) in llama seminal plasma is a protein molecule that is resistant to heat and enzymatic digestion with proteinase K, and has a molecular mass of approximately equal or higher than 30 kDa. Moreover, the ovulation-inducing factor has been detected in seminal plasma of species that are not classified as induced ovulators. Nevertheless, the ovulation rate is always significantly lower on the intrauterine infusion of seminal plasma than on the i.m. injection.

Immune response

Semen is a mixture of secretions from testes, epididymus and accessory glands and can modulate a variety of immunological functions. Since the seminal dose plus the GnRH analogue both are carrying proteins that are foreign to the female, successful fertilization depends on a balance between tolerance to paternal alloantigens and immune reactivity against foreign pathogens. Protective immunity is provided by both the cellular and humoral systems. The vaginal mucosa is the most common site of initiation of virus infections. Pandya and Cohen (1998) suggest that leukocytes from these channels are released within 15 min as a response to cervical deposition of spermatozoa. Drobniz and Overstreet (1992) suggest that this physiological inflammatory response occurs in response to insemination, and phagocytosis of spermatozoa by leukocytes takes place. Cohen and Tyler (1980) suggested that the cervical leucocytosis removes excess spermatozoa from the female tract and prevents cervical passage after the fertilizing spermatozoa have entered, so that the female does not become sensitized to spermatozoa. Since most spermatozoa remaining in the female tract are

destroyed by leucocytes, this leucocytosis could be functionally compared with the copulatory plug of rodents, being a device to prevent other males mating successfully with the same female (see review by Parker, 1970).
Rozeboom (1998, 1999) suggested that several factors may contribute to the recruitment of leucocytes in cell layers underneath the epithelium of pigs. They found that extender alone could elicit an early response, but spermatozoa triggered additional recruitment at 12 h after insemination. In contrast, Engelhardt *et al*. (1997) reported that seminal plasma, and not spermatozoa, triggered the influx of leucocytes into the stroma and epithelium of the endometrium of sows.
Information on immune cells in the female rabbit reproductive tract is very limited. In addition, compared with rodents, an obstacle to getting such information is that very few reagents are available for the characterization of immune cells in rabbits. An early study showed that T cells, together with a few IgA plasma cells and macrophages, are present in the endometrium. Secretions of the reproductive tract of rabbits are known to possess gamma globulins contributed by local secretion as well as from serum (Berhman *et al*., 1970). The two types of immunoglobulins detected in vagina are IgG, similar to that serum, and secretory IgA (Gómez *et al*., 2010). Gu *et al*. (2005) provided an analysis of basic immune cell distribution (lymphocites and MHC-II$^+$) in the female rabbit reproductive tract both before and after ovulation using an intravenous injection of 150 IU of HCG (Human Chorionic Gonadotrophin). After ovulation, lymphocytes CD45$^+$ increase in the vaginal muscularis mucosa and beneath of epithelium compared with non ovulated does. T cells were the dominant lymphocyte in the female reproductive tract, with only a few B cells being present in the tract. These dominant T cells are, like other species, important in local immunity against infection and in balancing Th1 and Th2 immune responses, and thus the tolerance and rejection of the conceptus (Roit, 1997). In rabbits, apart from in the uterus, i.m. induction of ovulation did not affect T-cell numbers in other regions of the reproductive tract and had no effect on uncommitted B cells and IgA$^+$ cell distribution. Nevertheless, anything is known about T and similar cell proliferations after a seminal dose deposition with an analogue of GnRH.
On the other hand, the inflammatory reaction initiated by irritating compounds or incorrect practices of artificial insemination may promote pathogens transmission by eroding the protective mucosal epithelial layers and release of proinflammatory cytokines capable of recruiting neutrophils, lymphocytes and monocytes (Trifonova *et al*., 2007). The interleukin (IL)-1, IL-6 and IL-8 are expressed constitutively at low levels by cervicovaginal epithelial cells in rabbits and are significantly induced by proinflammatory stimuli and common sexually transmitted pathogens (Fichorova *et al*., 2004). Thus, one cause of hypo-fertility depends on the sanitary condition of does. Genital tract inflammation and/or infection are one of the major causes of infertility (Gram *et al*., 2002) and often determined by incorrect practices of artificial insemination (AI). It has been demonstrated that uterine infection negatively affects fertility (Facchin *et al*., 1999) and prolongs the life span of *corpora lutea* (Boiti *et al*., 1999) due to uterine leukocytes infiltration, reduced prostaglandins synthesis and increased spermatozoa reabsorption. Castellini *et al*., (2005) showed that a systemic inflammation in rabbit does induced by inoculation of intra-peritoneal 100 µg Li-

popolysaccarides (LPS, constituents of the Gram-negative germ wall)/kg live weight, reduces the number of spermatozoa capable to achieve the oviduct probably by activating and increasing leucocytes number and spermatozoa reabsorption.

Muscular contractions

The third vaginal layer has smooth muscle fibres running in both circular and longitudinal directions. Significantly lower muscle content is observed in the urovagina (Oh *et al*., 2003). The presence of moribund, dead or disrupted spermatozoa in the oviducts within minutes of mating is attributed to muscular contractility of the female tract and attendant changes in intraluminal pressures (Overstreet and Cooper, 1978a). Steroid hormones regulate vaginal smooth muscle contractility in rabbit does (Kim *et al*., 2004). Ovariectomized animals exhibit significant atrophy of the vaginal muscularis and decreased epithelial height, resulting in thinning of the vaginal wall. Estradiol infusion increased epithelial height, comparable to that of intact animals, but only partially restored the muscularis layer. In contrast, testosterone infusion completely restored the muscularis layer, but only partially restored the epithelial height. The estradiol may be an important regulator of vaginal contractility and consequently of maintenance of seminal dose components in the adequate site to be absorbed.

Vagina innervations

The vagina is a richly innervated tissue. Normal vagino-cervical stimulation induces neuroendocrine and behavioral changes including the release of several neurotransmitters and signalling molecules as norepinephrine and nitric oxide. In all regions of vagina, a large contraction can be elicited by epinephrine or norepinephrine, so contractile function is mainly under the sympathetic control rather than cholinergic one (Oh *et al*., 2003). The effects of endogenous sex hormone levels (estradiol, progesterone) certainly change the receptor density or the receptor affinity to neurotransmitters and will define the response to mating.
The neural pathways via which sensory stimuli associated with mating reach and activate forebrain GnRH neurons in the rabbit female are still poorly understood. GnRH neurons lack oestrogen as well as progesterone receptors, implying that these steroid hormones act on GnRH neurones via norepinephrine, neuropeptide Y and opioid peptides (Bakker and Baum, 2000). About that, such ovulations have been demonstrated in receptive rabbit does inseminated with diluted semen, but without adding a GnRH synthetic analogue to seminal dose or using i.m injections (32.5%; Viudes de Castro *et al*., 2007). It was hypothesized that these ovulatory responses generated by the catheter intromission (genital-somato-sensory stimuli) could provoke a preovulatory LH release, but nothing is known regarding this. In our studies (Table 1), when we avoided vaginal stimulation with anaesthesia, rabbit does did not ovulate and LH concentrations were similar 0 and 60 min after induction of ovulation, and also similar to the group where only the saline was introduced. Nevertheless, in the saline group, some nervous stimuli (handling, catheter introduction, saline i.m. injection) could be enough to induce ovulation in 50% of does demonstrating that neural stimulus is very important in receptive rabbit does (Rebollar P.G., data unpublished).

Table 1 – Ovulatory response and pregnancy rate from does inseminated with an i.m. injection of 1 µg buserelin per doe (MB); with buserelin added to extender (VB; 10 µg/0.5 ml per doe); using a pool of undiluted semen and i.m. saline (RS); using 0.5 ml of saline and i.m. saline (S); received lumbar anaesthesia and only the empty glass catheter was introduced in the vagina and i.m. saline (A). (a, b, c: P < 0.05).

GROUP	Ovulation Rate (%)	Pregnancy Rate (%)	Corpora lutea no.	Embryos no.
MB	100 a	70 a	11.0 ±0.98 a	10.4±1.29 a
VB	100 a	100 a	11.8 ±0.70 a	12.0±0.68 a
RS	62.5 b	50 b	12.2 ±0.73 a	13.3±0.75 a
S	50 b	0 c	13.5 ±1.55 a	0 b
A	0 c	0 c	0 b	0 b

Sexual receptivity and hormone profile

The vagina is a target tissue for estrogens, progestins, and androgens. Steroidal compounds possessing estrogenic and androgenic properties modulate vaginal function by multiple mechanisms. Estrogen plays an important role in regulating vaginal vascularity through activation of endothelial nitric oxide synthase (Berman *et al*., 1998). Histologically, loose connective tissue and extensive fat cells replace smooth muscle fibers in the clitoral cavernosum after surgical ovariectomy in rabbits reducing the blood vaginal flow (Ganesan *et al*., 2009). Therefore, more sexual receptivity greater the degree of vascularization of the mucosa increase their absorptive capacity. Traish *et al*. (2004) strongly support the presence of a nuclear protein that binds Δ^5-androstene-3β, 17β-diol distinct from that of the estrogen and androgen receptors. Although the significance of these observations remains to be determined, it has been suggested that this steroid stimulates myelopoiesis, increases the number of circulating neutrophils and platelets and enhances resistance to infection. Since the vagina is an open canal which serves as a sexual and a reproductive organ, it is speculated that this steroid may play a role in vaginal host defence mechanisms.
Hormones resulting from ovarian follicular growth and corpus luteum formation and regression are associated with histological and histochemical changes in the vagina that are accompanied by alterations in its passive electrical properties. Significant changes in vaginal impedance in cyclic females have been described (reviewed in Rezàc, 2008). In general it is well documented that vaginal electrical resistance (VER) reaches a minimum value during the follicular phase and a maximum during the luteal phase on sows (Rezàc and Olic, 1988; Ko *et al*., 1989). Interestingly, there are obvious relationships between VER fluctuations and changes in plasma concentrations of circulating hormones. The monitoring of VER changes can provide a more reliable indication of the preovulatory LH surge than detection of estrus in species as sows, mares, etc (Rezàc, 2008), but in rabbits little is known about these fluctuations and their influence in the mucose absorption properties.

Physicochemical properties of the GnRH analogue

Hussain and Ahsan, (2005) consider that the degree of ionization, solubility in water, and molecular weight of drugs are the most important physicochemical proper-

ties affecting vaginal absorption. It is generally accepted that low molecular weight lipophilic substances are likely to be absorbed more than large molecular weight lipophilic or hydrophilic drugs. Generally, hydrophilic compounds prefer the paracellular route, with its molecular size being inversely related to its absorption rate. Whereas, lipophilic compounds prefer the transcellular route, most commonly by passive diffusion through the epithelium down the concentration gradient. The intravaginal devices impregnated with progesterone or synthetic progestagen such as fluorogestone acetate (FGA) or medroxyprogesterone acetate (MAP) are usually employed in other species (Karaca *et al*., 1999). These steroids are lipophilic, have low molecular weight and are absorbed continuously through the mucose during a period of time.

However, since vaginal fluids have some amount of water, any substance intended for vaginal delivery requires a certain degree of solubility on water (Hussain and Ahsan, 2005). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is a hypothalamic decapeptide that plays a critical role in the regulation of reproductive processes (Conn and Crowley, 1994). GnRH is a member of a larger family of peptides that is present in every vertebrate class examined thus far (Tsai and Zhang, 2008). Currently, 23 different isoforms of GnRH have been identified in various species (Metallinou *et al*., 2007). All of these peptides consist of 10 amino acids having a similar structure, with at least 50% sequence homology (Dubois *et al*., 2002). They have been named according to the species from which they were originally isolated (Metallinou *et al*., 2007). GnRH analogues, triptorelin, leuprolide, buserelin, gonadorelin, dalmarelin, etc. are used to induce ovulation in rabbit does by means an i.m. injection. Recently, some studies have demonstrated that ovulation can be induced in rabbit females by absorption through the vaginal mucosa of different GnRH analogues included in the seminal dose, avoiding i.m. administration (Viudes de Castro *et al*., 2007; Ondruska *et al*., 2008; Quintela *et al*., 2008). Vicente *et al*. (2008) suggest that there are some factors influencing absorption of GnRH by the vaginal mucosa: the state of mucosa (secretions induce by receptivity state of female), extender composition and probably the capacity of sperm to incorporate foreign molecules.

Moreover, GnRH analogues are susceptible to the proteolytic enzymes due to its peptidic characteristic resulting in low intestinal absorption and bioavailability (less that 1%) following either oral or intraduodenal injections in several animal models. The GnRH analogues can be hydrolyzed at three bonds Trp^3-Ser^4, Ser^4-Tyr^5, Tyr^5-Gly^6, the first one being the preferred (Stephenson and Kenny 1988). The cell layers of the vagina retain most of the enzyme activity. Among the enzymes present, proteases are likely to be the prominent barrier for the absorption of intact peptide and protein into the systemic circulation. In rabbit vaginal epithelium extracts there are high concentrations of aminopeptidases (Sayani *et al*., 1993). Maybe it is one of the reason by it is necessary increasing about 10 times the i.m. dose of buserelin, when it is included in the intravaginal seminal doses.

In summary, some studies have demonstrated that ovulation can be induced in rabbit females by absorption through the vaginal mucosa of different GnRH analogues included in the seminal dose, avoiding i.m. administration. A long list of factors affects the efficacy of above intravaginal administration: the dissolution degree in vag-

inal lumen, the membrane thickness, the degradation or blockage due immunoglobulins, cytokines, proteases, the leucocytosis, the fast or slow transport to the uterus by means muscle contractions, the hormone profile, the conductivity, etc. Further studies about all above parameters are needed to deepen the mechanisms involved in the absorption of hormones like analogues of GnRH through of vaginal barrier.

REFERENCES

Adaikan, P.G., Srilata, B., Wheat, A.J., 2009. Efficacy of red clover isoflavones in the menopausal rabbit model. Fert. Steril. 92:2008-2013.

Bakker, J., Baum, M.J., 2000. Neuroendocrine Regulation of GnRH Release in Induced Ovulators. Frontiers in Neuroendocrinology 21:220-262.

Barberini, F., Correr, S., De Santis, F., Motta, PM., 1991. The epithelium of the rabbit vagina: a microtopographical study by light, transmission and scanning electron microscopy. Arch. Histol. Cytol. 54:365-378.

Behrman, S.J., Lieberman, M.E., Uchiyama, N., Ansbacher, R., 1970. Immunoglobulin synthesis of the rabbit reproductive tract in vitro. In A.I. Sherman (ed.) Pathways to Conception 14, p. 237.

Benziger, D.P., Edelson, J., 1983. Absorption from the vagina. Drug Metab. Rev. 14:137-168.

Blandau, R.J., 1973. Sperm transport through the mammalian cervix: comparative aspects. In: R.J. Blandau and K.S. Moghissi (eds.) Biology of the cervix. University of Chicago Press, Chicago, pp. 285-304.

Boiti, C., Canali, C., Brecchia, G., Zanon, F., Facchin, E., 1999. Effects of induced endometritis on the life-span of corpora lutea in pseudopregnant rabbits and incidence of spontaneous uterine infections related to fertility of breeding does. Theriog. 52:1123-1132.

Castellini, C., Cardinali, R., Brecchia, G., Dal Bosco, A., 2005. Effect of LPS-induced inflammatory state on some aspects of reproductive function of rabbit does. Ital. J. Anim. Sci. 4(2):532-584.

Chen, B.X., Yuen, Z.X., Pan, G.W., 1985. Semen induced ovulation in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). J. Reprod. Fertil. 73:335-339.

Cohen, J., Tyler, K.R., 1980. Sperm populations in the female genital tract of the rabbit. J. Reprod. Fert. 60:213-218.

Conn, P.M., Crowley, W.F. Jr., 1994. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. Annu. Rev. Med. 45:391-405.

Cooper, G.W., Overstreet, J.W., Katz, D.F., 1979. The motility of rabbit spermatozoa recovered from the female reproductive tract. Gamete Res. 2:35-42.

De Ziegler, D., Buletti, C., De Monstier, B., Jaaskelainen, A.S., 1997. The first uterine pass effect. Ann. NY Acad. Sci. 828:291-299.

Dhondt, M.M.M., Adriaens, E., Van Roey, J., Remon, J.P., 2005. The evaluation of the local tolerance of vaginal formulations containing dapivirine using the slug mucosal irritation test and the rabbit vaginal irritation test. Europ. J. Pharmaceutics Biopharmaceutics 60:419-325.

Drobniz, E.Z., Overstreest, J.W., 1992. Natural history of mammalian spermatozoa in the female reproductive tract. In: S.R. Mulligan (ed.) Oxford Reviews of Reproductive Biology, 14 Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 1-45.

Dubois, E.A., Zandbergen, M.A., Peute, J., Goos, H.J., 2000. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. Brain Res. Bull. 57:413-418.

Dusza, L., Opałka, M., Kaminska, B., Kaminski, T., Ciereszko, R.E., 1996. The relationship between electrical resistance of vaginal mucus and plasma hormonal parameters during periestrus in sows. Theriog., 45:1491-1503.

Engelhardt, H., Croy, B.A., King, G.J., 1997. Role of uterine immune cells in early pregnancy in pigs. J. Reprod. Fert. Supp. 52:115-131.

Facchin, E., Zanon, F., Castellini, C., Boiti, C., 1999. Hypofertilité chez la lapine; étude sur les causes possibles et les traitements. In: Proc. 8èmes J. Rech. Cun., pp. 159-161.

Fichorova, R.N., Bajpai, M., Chandra, N., Hsiu, J.G., Spangler, M., Ratnam, V., Doncel, G.F., 2004. Interleukin (IL)-1, IL-6, and IL-8 predict mucosal toxicity of vaginal microbicidal contraceptives. Biology of Reproduction 7:761-769.

Gómez, V.R., Vinner, L., Grevstad, B., Hansen, J.J., Wegmann, F., Spetz, A., Fomsgaard, A., 2010. Development of standard operating procedures to obtain longitudinal vaginal specimens from nulliparous rabbits as part of HIV vaccine mucosal. J. Immunol. Meth. 363:29-41.

Gram, L.F., Zapata, M.I., Toy, E.C., Baker, B., 2002. Genitourinary infections and their association with preterm labor. Am. Fam. Phys. 65:241-248.

Gu, W., Janssens, P., Holland, M., Seamark, R., Kerr, P., 2005. Lymphocytes and MHC class II positive cells in the female rabbit reproductive tract before and after ovulation. Immunology and Cell Biology 83:596-606.

Hussain, A., Ahsan, F., 2005. The vagina as a route for systemic drug delivery. Journal of controlled release 103:301-313.

Hwang, S., Owada, I., Suhardja, N.F.H., Ho, G.L., Flynn, W.I., 1977. Systems approach to vaginal delivery of drugs: IV. Methodology for determination of membrane surface pH. J. Pharm. Sci. 66:778-771.

Jacques, M., Olson, M.E., Crichlow, A.M. Osborne, A.D., Costerton, J.W., 1986. The normal microflora of the female rabbit's genital tract. Can. J. Vet. Res. 50:272-274.

Karaca, F., Ataman, M.B., Coyan, K., 2009. Synchronization of estrus with short- and long-term progestagen treatments and the use of GnRH prior to short-term progestagen treatment in ewes. Small Ruminant Res. 81:185-188.

Kim, N.N., Min, K., Pessina, M.A., Munarriz, R., Goldstein, I., Traish, A.M., 2004. Effects of ovariectomy and steroid hormones on vaginal smooth muscle contractility. Int. J. Impot. Res. 6:43-50.

Match, D.I., 1918. The absorption of drugs and poisons through vagina. J. Pharmacol. Pathol. 10:509-522.

Metallinou, C., Asimakopoulos, B., Schröer, A., Nikolettos N., 2007 Gonadotropin-releasing hormone in the ovary. Reprod. Sci., 14:737-749.

Noguchi, K, Tsukumi, K, Urano, T., 2003. Qualitative and quantitative differences in normal vaginal flora of conventionally reared mice, rats, hamsters, rabbits, and dogs. Comp Med., 53:404-12.

Noyes, R.W., Adam, C.E., Walton, A., 1958. Transport of spermatozoa into the uterus of the rabbit. Fertil. Steril. 9:288-299.

Oh, S-J., Hong, S.K., Kim, S.W., Paick, J-S., 2003. Histological and functional aspects of different regions of the rabbit vagina. International J. Impotence Research 15:142-150.

Okada, H.I., Yamazaki, Yashiki, T., Mima, H., 1983. Vaginal absorption of a potent luteinizing hormone releasing hormone analogue (leuprolide) in rats. II. Mechanism of absorption enhancement with organic acids. J. Pharm. Sci. 72:75-78.

Ondruska, L., Parkányi, V., Rafay, J., Chlebec, I., 2008. Effect of LHRH analogue included in seminal dose on kindling rate and prolificacy of rabbits artificially inseminated. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, p. 122.

Otsuki, Y., Maeda, Y., Magari, S., Kubo, H., Sugimoto, O., 1990. Lymphatics, intraepithelial lymphocytes and endometrial lymphoid tissues in the rabbit uterus: an electron microscopic and immunohistological study. Lymphology 23:124-34.

Overstreet, J.W., Cooper G.W., 1978a. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit. I. The rapid transit phase of transport. Biol. Reprod. 19:101-114.

Pan, G., Zhao, X., Chen, S., Jiang, S., Huang, Y., Zu, Y., Wang, H., 1992. The ovulation-inducing effect of seminal plasma in the bactrian camel. In: Proc. First International Camel Conf., Newmarket, pp. 159-161.

Pandya, I.J., Cohen, J., 1985. The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa. Fertility and Sterility 43:417-421.

Paolicchi, F., Urquieta, B., Del Valle, L., Bustos-Obregón, E., 1999. Biological activity of the seminal plasma of alpacas: stimulus for the production of LH by pituitary cells. Anim. Reprod. Sci. 54:203-210.

Parker, G.A., 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Biol. Rev. 45:525-568.

Quintela, L.A., Peña, A.I., Vega, M.D., Gullón, J., Prieto, C., Barrio, M., Becerra, J.J., Herradón, P.G., 2008. Ovulation induction in rabbit does by intra vaginal administration of the GnRH analogue [Des-Gly10, D-Ala6] LHRH ethylamide: field trial. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, p. 123.

Ratto, M.H., Huanca, W., Adams, G.P., 2010. Ovulating-inducing factor: a protein component of llama seminal plasma. Reprod. Biol. Endocrinol. 8:44.

Razi, M., Akhtari, K., Najafpour, A.R., Abdi, K., Shahrooz, R., Shahmohamadloo, S., Feyzi, S., Cheragi, H., 2010. Effect of bilateral uterine artery ligation on follicular atresia in ovaries of mature female rabbits; histomorphometric and histochemical study. Iran. J. Reprod. Med. 8:101-110.

Rezàc, P., 2008. Potential applications of electrical impedance techniques in female mammalian reproduction. Theriogenology 70:1-14.

Rezàc, P., Olic, I., 1988. A relationship between the impedance pattern of the vaginal mucous membrane after weaning and the conception of sows inseminated according to the detection of the standing reflex. Scientia Agric. Bohemoslov. 20:111-118.

Richardson, J.L., Illum, L., 2002. Routes of drug delivery: case studies (8). The vaginal route of peptide and protein drug delivery. Adv. Drig Deli. Rev. 8:341-366.

Roitt, I., 1997 Essential Immunology. Wiley-Blackwell, Oxford.

Rozeboom, K.J., Troedsson, M.H., Crabo, B.G., 1998. Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination J. Reprod. Fert. 114:195-199.

Rozeboom, K.J., Troedsson, M.H., Molitor, T.W., Crabo, B.G., 1999. The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. J. Anim. Sci. 77:2201-2206.

Sayani, A.P., Chun, I.K., Chien, Y.W., 1993. Transmucosal delivery of leucine enkephalin: stabilization in rabbit enzyme extracts and enhancement of permeation through mucosae. J. Pharm. Sci. 82:1179-1185.

Stephenson, S.L., Kenny, A.J., 1988. The metabolism of neuropeptides: hydrolysis of peptides by the phosphoramidon-insensitive rat kidney enzyme endopeptidase 2 and by rat microvillar membranes. Biochem. J. 255:45-51.

Tsai, P.S., Zhang, L., 2008. The emergence and loss of gonadotropin releasing hormone in protostomes: orthology, phylogeny, structure, and function. Biol. Reprod. 79:798-805.

Viudes de Castro, M.P., Lavara R., Marco-Jiménez, F., Cortell, C., Vicente, J.S., 2000. Ovulation induced by mucosa vaginal absorption of buserelin and triptorelin in rabbit. Theriog. 68:1031-1036.

Waberski, D., Kremer, H., Borchardt Neto, G., Jungblut, P.W., Kallweit, E., Weitze, K.F., 1999. Studies on a local effect of boar seminal plasma on ovulation time in gilts. J. Vet. Med. 46:431-438.

Wingerd, B.D., 1984. Human anatomy and rabbit dissection. Baltimore, M.D. Johns Hopkins University press, pp. 121-123.

Xu, Y.S., Wang, H.Y., Zeng, G.Q., Jiang, G.T., Gao, H.Y., 1985. Hormone concentrations before and after semen-induced ovulation in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). J. Reprod. Fertil. 74:341-346.

LAVORI SCIENTIFICI

Sessione Riproduzione e Genetica

UTILIZZO DI UNA VAGINA ARTIFICIALE DIGITALE PER IL PRELIEVO DEL SEME DI CONIGLIO: RISULTATI PRELIMINARI

CARDINALI R.[1], DAL BOSCO A.[1], MOSCATI L.[2], CASTELLINI C.[1]

[1]*Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia, Italy*
[2]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Italy*
Alessando Dal Bosco, Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia, Borgo XX Giugno 74, 61121 Perugia, Italy - Tel. +39 075 5857110 - Fax: +39 075 5857122
*Corresponding author: dalbosco@unipg.it

ABSTRACT

Application of a digital artificial vagina for semen collection in rabbit buck: preliminary results

Nowadays artificial vagina in rabbitry is widely utilized. The aim of this study was to evaluate the effect of a digital artificial vagina on some quali-quantitative traits on rabbit buck semen. Twenty rabbit bucks were submitted to semen collection twice a week with two different artificial vagina: glass vagina (37-40°C) and digital vagina (47°C). For every ejaculate presence/absence of plug gel, volume, sperm concentration, motility, acrosoma status, lysozyme concentration, antioxidant power and total protein were recorded. The libido showed better values with digital vagina and the lowest percentage of plug gel promoting the use of this technique. Sperm concentration was in the range of good health bucks, as confirmed by lysozyme value and antioxidant power. In conclusion it is confirmed that the use of a digital vagina in rabbitry reduces the time to take off sperm samples and does not compromise the quality of ejaculates.

Keywords: Artificial vagina, Rabbit buck, Spermatozoa.

INTRODUZIONE

Negli anni '20 si è iniziato a parlare di Inseminazione Artificiale (IA) in coniglicoltura (Adams, 1961) come metodo alternativo alla monta naturale. Macimore e Walton nel 1938 furono i primi a proporre l'uso di una vagina artificiale per la raccolta del seme. Successivamente altri Autori (Walton, 1958; Gregoire *et al*., 1958) apportarono modifiche per indurre un miglior stimolo nel maschio, ma Bredderman *et al*. (1964) proposero per primi una vagina che, messa a scaldare alla temperatura di 50°C per 30 minuti, permetteva di ottenere una miglior libido nel coniglio. Attualmente sono ampiamente utilizzate vagine artificiali in PVC con l'apertura foderata in lattice (Sinkovics *et al*., 1993) e in vetro (Dal Bosco *et al*., 1996) che, riempite con acqua a

37°C, permettono di ottenere le migliori performance. Sulla base di queste considerazioni si è voluto analizzare l'effetto dell'utilizzo di una vagina artificiale digitale, la cui temperatura viene mantenuta costante mediante una batteria, su alcuni parametri quali-quantitativi del seme di coniglio.

MATERIALI E METODI

La prova è stata svolta presso la Sezione sperimentale del Dip. Biologia Applicata dell'Università di Perugia su 20 conigli maschi Bianca di Nuova Zelanda di 8 mesi d'età, mantenuti ad una temperatura ambientale compresa tra 16 e 25 °C e con un fotoperiodo di 16/8 ore luce/buio (Theau-Clement *et al*., 1996) ed alimentati *ad libitum*; gli stessi sono stati sottoposti a prelievo del seme due volte a settimana per 3 mesi consecutivi, alternativamente con vagina artificiale in vetro, la cui temperatura media è stata di 37-40°C, e con vagina artificiale digitale, la cui temperatura è stata di 47°C. La libido è stata valutata come il tempo trascorso dalla presentazione del manichino al momento dell'eiaculazione (Boiti *et al*., 2005). L'assenza dell'eiaculazione entro i 2 minuti è stata considerata come una mancata sollecitazione. Immediatamente dopo il prelievo sono stati valutati la presenza/assenza del tappo mucoso ed il volume mediante provetta graduata. La concentrazione di spermatozoi è stata determinata mediante camera contaglobuli Thoma-Zeiss (Boiti *et al*., 2005). La valutazione dei parametri cinetici degli spermatozoi è stata effettuata mediante software ISAS©, a 100 frame rate. L'integrità dell'acrosoma è stata analizzata mediate la metodica Mendoza *et al*. (1992). Inoltre sono stati analizzati lisozima (Osserman e Lawlor, 1996), metaboliti reattivi all'ossigeno (ROMs) e potere antiossidante (PAO), mediante un kit commerciale (Diacron, Grosseto, Italy), e proteine totali, mediante kit commerciale (Total protein, Sclavo, Italy). L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software Stata (StataCorp, 2005).

RISULTATI E CONCLUSIONI

La libido ha fatto registrare un minor tempo (-16,38 sec, $P<0,05$; Tabella 1) quando il seme è stato prelevato mediante la vagina digitale, probabilmente per la maggiore temperatura che meglio stimola il maschio ad eiaculare.

Tabella 1 – Effetto del tipo di vagina artificiale sulle caratteristiche dello sperma.

Tipo di vagina artificiale		Vetro	Digitale	DSE
Libido	sec	84,12[b]	67,74[a]	12,88
Volume eiaculato	ml	0,86	0,77	0,24
Tappo mucoso	%	22,22[b]	6,06[a]	35,46
Concentrazione	10×10^6/ml	255,04	296,55	74,01
Acrosoma integro	%	13,41	11,64	6,36
Spermatozoi immobili	%	25,70	14,95	10,60
Spermatozoi rapidi	%	72,72	82,73	16,29
VCL (velocità curvilinea)	µm/sec	241,14	237,56	42,09
VAP(velocità media)	µm/sec	132,89	131,35	22,74
LIN (linearità)	%	24,37	25,30	4,33
ALH (ampiezza dello spostamento laterale della testa)	µm	2,63	2,73	1,01
Lisozima	µg/ml	10,69	11,85	8,39
ROMs	mM H_2O_2	0,66	1,00	0,58
PAO (potere antiossidante)	µmol di HClO	250,79[b]	212,24[a]	28,81
Proteine Tot.	gr/l	23,78	23,72	5,38

n=240; P<0,05: a,b

Tale risultato non è stato accompagnato da variazioni significative a livello di volume e concentrazione spermatica, ma la più bassa percentuale di campioni seminali con tappo mucoso (6,06 *vs.* 22,22%; P<0,05) nel gruppo sperimentale conferma che l'utilizzo della vagina digitale permette la raccolta di un maggior numero di campioni di seme senza interruzioni per il cambio dell'acqua e l'eventuale manipolazione del seme per la diluizione. Passando ad analizzare le caratteristiche qualitative dei campioni seminali è possibile evincere che nessun parametro è stato modificato in maniera significativa dal tipo di vagina artificiale usata. La concentrazione spermatica ha fatto registrare valori che rientrano nel range della specie e di animali in buono stato sanitario (Brecchia *et al.*, 2010). Il lisozima è un forte enzima antibatterico, normalmente presente nei liquidi fisiologici che presenta un'azione anti Gram$^+$ (Carrol e Martinez, 1979). Il fatto che tale parametro non sia variato dimostra che l'uso della vagina digitale non va a pregiudicare i parametri immunitari del liquido seminale. Per ciò che concerne lo stress ossidativo, è possibile affermare che l'utilizzo della vagina digitale ha determinato una riduzione significativa della PAO ed un tendenziale aumento dei ROMs, probabilmente in virtù della maggiore temperatura di prelievo. La quantità di proteine totali non ha risentito della tecnica utilizzata.
In conclusione l'utilizzo di una vagina artificiale digitale, con temperatura costante a 47°C, permette di ottimizzare i tempi di prelievo e di ridurre la presenza di tappo mucoso, senza modificare le caratteristiche quali-quantitative dell'eiaculato. Ulteriori studi sono necessari per l'individuazione della temperatura ottimale al fine di ridurre lo stress ossidativo del seme.

BIBLIOGRAFIA

Adams, C.E., 1961. Artificial insemination in the rabbit. J. Reprod. Fertil. 2:521-522.

Boiti, C., Castellini, C., Besenfelder, U., Theau-Clèmente, M., Liguori, L., Renieri, T., Pizzi, F., 2005. Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. World Rabbit Sci. 13:71-91.

Brecchia, G., Cardinali, R., Mourvaki, E., Collodel, G., Moretti, E., Dal Bosco, A., Castellini, C., 2010. Short- and long-term effects of lipopolysaccharide-induced inflammation on rabbit sperm quality. Anim. Reprod. Sci. 118:310-316.

Bredderman, P.J., Foote, R.H., Yassen, A.M., 1964. An improved artificial vagina for collecting rabbit semen. J. Reprod. Fertil. 7:401-403.

Carroll, S.F., Martinez, R.J., 1979. Role of rabbit lysozyme in *in vitro* serum and plasma serum bactericidal reactions against *Bacillus subtilis* infect. Immun. 2:810-819.

Dal Bosco, A., Scuota, S., Castellini, C., Cenci, T., 1996. Study of an artificial vagina to reduce the microbial contamination of rabbit semen. World Rabbit Sci. 4:201-204.

Gregoire, A.T., Bratton, R.W., Foote, R.H., 1958. Sperm output and fertility of rabbits ejaculated either once a week or once a day for forty-three weeks. J. Anim. Sci. 17:243.

Macimore, C., Walton, A., 1938. Fecundy of male rabbits as determined by "dummy matings". J. Agric. Sci. 28:122.

Mendoza, C., Carreras, A., Moos, J., Tesarik, J., 1992. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. J. Reprod. Fertil. 95:755-763.

Osserman, E.F., Lawlor, D.P., 1996. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. J. Exp. Med. 124:921-952.

Sinkovics, G., Cenci, T., Scuota, S., Dal Bosco, A., 1993. Un'idea per la F.A. Coniglicoltura 30(9):35-36.

StataCorp, 2005. Stata Statistical Software: Release 9.0, College Station, Texas, USA.

Theau-Clement, M., Lattaioli, P., Roustan, A., Castellini, C., 1996. A comparison between computerised semen image analyses and visual methods to evaluate various biological parameters in rabbit semen. In: Proc. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, France, 2:133-137.

Walton, A., 1958. Improvement in the design of an artificial vagina for the rabbit. J. Physiol. 143: 26-34.

ANALISI DI GENI CANDIDATI PER IL LOCUS *DILUTE* CHE DETERMINA LA DILUZIONE DEL COLORE DEL MANTELLO NEL CONIGLIO

FONTANESI L.[1], SCOTTI E.[1], COLOMBO M.[1], DALL'OLIO S.[1], OULMOUDEN A.[2], RUSSO V.[1]

[1]*DIPROVAL, Sezione di Allevamenti Zootecnici, Università di Bologna, Italy*
[2]*UMR1061, Génétique Moléculaire Animale, INRA/Université de Limoges, France*
Luca Fontanesi, DIPROVAL, Sezione di Allevamenti Zootecnici, Università di Bologna,
Via F.lli Rosselli 107, 42123 Reggio Emilia, Italy - Tel. +39 0522 290516 - Fax: +39 0522 290523
*Corresponding author: luca.fontanesi@unibo.it

ABSTRACT

Investigation of candidate genes for the *dilute* coat colour locus in rabbit

Several coat colour loci remain to be characterized at the DNA level in the rabbit. Among them, the *dilute* locus is determined by a recessive coat colour mutation that dilutes the black to blue (grey) and the yellow to beige interacting with the basic colours influenced by the *Agouti* and *Extension* mutations. We selected two candidate genes for this locus (*PMEL* and *MYO5A*) and resequenced several parts of them in 8 rabbits of different coat colour (including rabbit with blue pigmentation) for a total of ~22 kb. Six single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified (2 in *PMEL* and 4 in *MYO5A*). These SNPs were not completely associated with any coat colour in the sequenced rabbit panel. Other genes should be investigated in order to characterize the *dilute* coat colour locus in rabbit.

Key words: MYO5A, PMEL, SNP, Dilute coat colour locus.

INTRODUZIONE

Subito dopo la riscoperta delle leggi di Mendel, il colore del mantello del coniglio è stato oggetto di studi pionieristici che hanno posto le basi genetiche di questo carattere fenotipico e hanno permesso di stabilire omologie di colorazione con altri mammiferi (Castle, 1905; Punnet, 1912; 1915; Robinson, 1958; Searle, 1968). Questi studi di genetica classica hanno evidenziato diversi loci con effetto sul colore del mantello nel coniglio: *Agouti* (*A*), *Extension* (*E*), *Albino* (*C*), *Brown* (*B*), *Dilute* (*D*), *Dutch (Du), English* (*En*), *Viennese white* (*V*) e *Silver* (*Si*) oltre ad altri, ciascuno con una propria serie allelica a volte non ben caratterizzata (Robinson, 1958; Searle, 1968; Fox, 1994). Al momento, sono stati caratterizzati dal punto di vista molecolare diversi alleli per solo tre di questi loci (*Albino*, *Agouti* e *Extension*). Il locus *Albino* codifica per il gene *Tyrosinase* (*TYR*) nel quale sono state identificate mutazioni che causano i caratteristici albinismi delle razze Bianca di Nuova Zelanda e Californiana, oltre che

all'allele che determina il caratteristico colore Cincillà (Aigner et al., 2000). I loci *Extension* (*E*) e *Agouti* (*A*), che manifestano effetti epistatici, controllano la relativa proporzione dei due tipi di melanina, eumelanina e feomelanina. Il locus *Extension* codifica per *Melanocortin receptor 1* (MC1R) (Robbins *et al*., 1993) che è una proteina transmembrana della famiglia dei *G-protein-coupled receptors*, espressa nei melanociti. Mutazioni in questo gene sono state associate a differenti colori del mantello nel coniglio, tra cui il nero dominante (allele E^D), il rosso recessivo (allele *e*), caratteristico delle razze Fulva di Borgogna e Rossa di Nuova Zelanda, e l'allele e^J, caratteristico delle razze Giapponese e Pezzata tricolore (Fontanesi *et al*., 2006; 2007; 2010b). Il locus *Agouti* codifica per una proteina paracrina (*agouti signaling protein*, ASIP) (Bultman *et al*., 1992) che agisce come antagonista dell'ormone MSH legandosi a MC1R, inibendone l'interazione e quindi la sua attivazione con conseguente produzione di feomelanine. Una mutazione nell'esone 2 del gene *ASIP* determina l'allele *a* non-agouti che produce una colorazione nera recessiva (Fontanesi *et al*., 2010a).
Il locus *dilute* è caratterizzato da un allele recessivo che diluisce il nero a blu (o grigio) e il giallo/rosso a beige, interagendo con le colorazioni di base determinate dai loci *Extension* e *Agouti* (Robinson, 1958; Searle, 1968; Fox, 1994). In altre specie, in particolare nel topo e nel bovino, simili effetti fenotipici sono causati da mutazioni in alcuni geni tra cui i geni *premelanosome protein* (*PMEL*) – conosciuto anche con il nome di *melanocyte protein Pmel 17* (*PMEL17*) o *silver* (*SILV*) – e *myosin VA* (*MYO5A*) (Mercer *et al*., 1991; Martinez-Esparza *et al*., 1999; Oulmouden *et al*., 2005). Questi geni codificano per proteine che svolgono un ruolo come componenti dei melanosomi o nel trasporto di questi organelli cellulari, e quindi coinvolte nei meccanismi di determinazione della pigmentazione. Dal punto di vista applicativo, ad esempio, nella specie bovina una mutazione del gene *PMEL* è utilizzata per la tracciabilità della carne di razza Charolais (Oulmouden *et al*., 2005). Mutazioni in altri geni che determinano il colore del mantello sono utilizzate per la tracciabilità di prodotti monorazza in diverse specie di interesse zootecnico (Fontanesi, 2009). Con l'obiettivo di individuare il gene che determina il locus *dilute*, qui riportiamo l'identificazione di polimorfismi del DNA (SNP) nei geni *PMEL* e *MYO5A*, che possono essere utilizzati in studi di associazione con il fenotipo oggetto di studio.

MATERIALI E METODI

Otto conigli di diverse razze e linee famigliari con diverso colore del mantello (incluso il colore blu) sono stati utilizzati per il sequenziamento di diverse parti dei geni *PMEL* e *MYO5A* nel coniglio. Il DNA è stato isolato da sangue e/o da bulbi piliferi utilizzando protocolli standard o seguendo le indicazioni riportate da Fontanesi *et al*. (2006; 2007). Quattro coppie di primers sono state disegnate per ciascun gene sulle sequenze disponibili in Ensembl. Tutte le coppie amplificano regioni esoniche e regioni introniche contigue. Le amplificazioni sono state effettuate in un volume di 20 µl contenenti 1 U di EuroTaq DNA polimerasi (EuroClone Ltd.), 1X PCR Buffer, 2,5 mM dNTPs, 10 pmol di ciascun primer e 1,0 mM di $MgCl_2$. Il profilo PCR utilizzato, su un termociclatore PTC-100 (MJ Research), è stato il seguente: 5 minu-

ti a 95 °C; 35 cicli di amplificazione di 30 secondi a 95 °C, 30 secondi a 57-62 °C, 30 secondi a 72 °C; 10 minuti a 72°C. I prodotti PCR sono stati utilizzati, dopo trattamento con ExoSAP-IT® (USB Corporation), per la reazione di sequenziamento effettuata utilizzando il kit Big Dye v3.1 (Applied Biosystems). Le reazioni di sequenziamento, dopo alcuni passaggi di purificazione, sono state caricate su un sequenziatore a capillare (ABI3100 Avant sequencer, Applied Biosystem). Le sequenze ottenute sono state analizzate utilizzando il software CodonCode Aligner software (CodonCode Corporation).

RISULTATI E CONCLUSIONI

L'attività di risequenziamento del gene *PMEL* ha prodotto, in totale, 10456 bp di sequenze. Dalla loro analisi sono stati identificati solo 2 SNP, entrambi localizzati in regioni introniche (g.39510357G>A; g.39508302G>A). Nel pannello usato per il sequenziamento, i due SNP risultano in *linkage disequilibrium*. Dai dati di sequenziamento non sembra che conigli con diverso colore del mantello riportino alleli alternativi negli SNP identificati.
Il risequenziamento del gene *MYO5A* ha prodotto, in totale, 11192 basi di sequenze. Diversi SNPs sono stati identificati in regioni introniche (g.20112264C>T; g.20122143C>T) o in regioni esoniche codificanti (g.20122039G>A, g.20121949G>A), anche se queste ultime sono varianti sinonime, cioè che non cambiano aminoacido. Anche per i polimorfismi in questo gene, non sembra vi sia una associazione tra gli SNP identificati e la presenza/assenza di colorazione blu del mantello. Da questa prima analisi emerge che i polimorfismi identificati nei geni *PMEL* e *MYO5A* non sono associati con il colore blu del mantello (diluito). Tuttavia la genotipizzazione di alcuni di questi SNP in famiglie in cui segrega anche il colore blu del mantello potrà essere utile per confermare questo risultato. Altri geni candidati dovranno essere studiati per evidenziare marcatori associati con la diluizione del colore del mantello nel coniglio.

BIBLIOGRAFIA

Aigner, B., Besenfelder, U., Müller, M., Brem, G., 2000. Tyrosinase gene variants in different rabbit strains. Mamm. Genome 11:700-702.

Bultman, S.J., Michaud, E.J., Woychik, R.P., 1992. Molecular characterization of the mouse agouti locus. Cell 71:1195-1204.

Castle, W.E., 1905. Heredity of coat characters in guinea pigs and rabbits. Carnegie Inst. Washington Publ. 23, pp. 1-78.

Fontanesi, L., 2009. Genetic authentication and traceability of food products of animal origin: new developments and perspectives. Ital. J. Anim. Sci. 8(Suppl. 2):9-18.

Fontanesi, L., Tazzoli, M., Beretti, F., Russo, V., 2006. Mutations in the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) are associated with coat colours in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Anim. Genet. 37:489-493.

Fontanesi, L., Tazzoli, M., Russo, V., 2007. Non-invasive and simple methods for

sampling rabbit DNA for PCR analysis of melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene mutations: a technical note. World Rabbit Sci. 15:121-126.

Fontanesi, L., Forestier, L., Allain, D., *et al*., 2010a. Characterization of the rabbit agouti signaling protein (*ASIP*) gene: transcripts and phylogenetic analyses and identification of the causative mutation of the nonagouti black coat colour. Genomics 95:166-175.

Fontanesi, L., Scotti, E., Colombo, M., *et al*., 2010b. A composite six bp in-frame deletion in the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene is associated with the Japanese brindling coat colour in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). BMC Genet. 11:59.

Fox, R.R., 1994. Taxonomy and Genetics. In: P.J. Manning, D.H. Ringler, C.E. Newcomer (eds), The Biology of the laboratory rabbit. 2nd edition, Academic Press, San Diego, CA, pp. 1-26.

Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Bennett, D.C., *et al*., 1999. The mouse *silver* locus encodes a single transcript truncated by the *silver* mutation. Mamm. Genome 10:1168-1171.

Mercer, J.A., Seperack, P.K., Strobel, M.C., *et al*., 1991. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. Nature 349:709-713.

Oulmouden, A., Julien, R., Laforet, J.-M., Leveziel, H., 2005. Use of silver gene for authentication of the racial origin of animal populations, and of the derivative products thereof. Patent Publication WO2005/019473.

Punnett, R.C., 1912. Inheritance of coat colour in rabbits. J. Genet. 2:221-238.

Punnett, R.C., 1915. Further experiments on the inheritance of coat colour in rabbits. J. Genet. 5:38-50.

Robbins, L.S., Nadeau, J.H., Johnson, K.R., Kelly, M.A., Roselli-Rehfuss, L., Baack, E., Mountjoy, K.G., Cone, R.D., 1993. Pigmentation phenotypes of variant Extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. Cell 72:827-834.

Robinson, R., 1958. Genetic studies of the rabbit. Bibliogr. Genet. 17:229-558.

Searle, A.G., 1968. Comparative genetics of coat colour in mammals. Logos Press, London, UK.

EFFECT OF FEEDING PROGRAM BEFORE WEANING ON THE PERFORMANCE OF RABBIT DOES AND THEIR KITS

GERENCSÉR ZS.[1], MATICS ZS.[2], NAGY I.[1], SZENDRŐ ZS.[1]

[1]*Kaposvár University, Hungary*
[2]*MTA-KE, Research Group of Animal Breeding and Hygiene, Kaposvár, Hungary*
Zsolt Gerencsér, Kaposvár University, H-7400 Kaposvár, Guba S. str. 40, Hungary
Tel. +36 82-505-800 - Fax: +36 82-320-167
*Corresponding author: gerencser.zsolt@ke.hu

ABSTRACT

The aim of the experiment was to examine the effect of the feeding program between the 21st day of lactation and weaning on performance of rabbit does and their kits. The does and their kits received a lactation diet until weaning during the whole experiment (BB group; n=60) or a lactation diet until the 21st day of lactation and a post-weaning diet until weaning (BG group; n=59). After weaning, all kits consumed the same diet for growing rabbits. No significant differences were observed between the BB and BG groups for number of inseminations per parturition, body weight of the does at parturition and at 21st day of lactation, litter size, feed conversion ratio and mortality of kits. The feeding program affected the body weight of the does at the 35th day of lactation (4610 *vs*. 4530 g in BB and BG group, respectively; P=0.016), the litter weight at day 35 (8160 *vs*. 7834 g; P=0.001) and the does condition at kindling measured by the TOBEC method (P=0.024). Body weight of the growing rabbits was higher in the BB group at the ages of 5 and 7 weeks (984 *vs*. 937 g, P<0.001; 1651 *vs*. 1621 g, P=0.008, respectively), but the differences were not significant afterwards. It could be concluded that it is advantageous to feed both does and kits with the lactation diet until weaning.

Key words: Feeding program, Rabbit does, Reproductive results, Growth performance.

INTRODUCTION

In the rabbit farms the does and their kits may receive the same pelleted diet for lactation until weaning or a post-weaning diet from the 21st day of lactation until weaning. However, the nutrient demands of the does and kits are different (Fortun-Lamothe and Gidenne, 2003). The energy and nutritional requirements of rabbit does are: 11 MJ/kg DE, 18-19% crude protein, >13.5% ADF, >3% ADL, >30% NDF, and <20% starch, while 3-6 weeks-old rabbits need 9.5 MJ/kg DE and 15-16% crude protein, >19% ADF, >5.5% ADL, >32% NDF, and <14% starch (Lebas, 2004). The aim of the experiment was to compare the effects of two feeding programs, lactation diet

till weaning or change to a post-weaning diet from the 21st day of lactation, on reproductive results of does and growth performance of rabbits.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted at the Kaposvár University with Pannon White rabbits. Two groups were formed using commercial diets. In the first group the does and their kits received a lactation pelleted diet from parturition to weaning (DE: 10.4 MJ/kg, crude protein: 18.7%, crude fibre: 13.6%, starch 18.5%; BB group; n=60 does, 228 parturitions), in the second group the lactation diet was replaced by a post-weaning diet from the 21st day of lactation until weaning (DE: 9.7 MJ/kg, crude protein: 16.0%, crude fibre: 17.2%, starch 15.1%; BG group; n=59 does, 234 parturitions). After weaning all does received lactation diet and the kits consumed post-weaning diet but between 9 and 11 weeks fattening diet was supplied (DE: 10.5 MJ/kg, crude protein: 16.0%, crude fibre: 14.6%, starch 18.6%). Diets were given *ad libitum*. The does were first inseminated at the age of 16.5 weeks, then a 42-day reproduction rhythm was used. Five reproductive cycles were evaluated. The litters were standardized according to the average number of kits born alive in each group (maximum 10 kits/litter). Non-pregnant after two successive AI,, sick does and does with weak conditions were culled. The body conditions of does were evaluated by total body electrical conductivity (TOBEC) measurements (E-value by EM-SCAN) on randomly selected rabbit does (n=30) from every group. The kits were weaned at the age of 35 days and their production was controlled till 77 days of age. The productive performance of does and kits were evaluated by means of multifactor ANOVA; mortality was analyzed by chi-square test using SPSS 10.0 software package. To evaluate the body condition of does (E-value), their live weight at the day of measurement was considered as covariate.

RESULTS AND CONCLUSION

The results are summarized in Table 1.

Table 1 – The effect of the feeding program on the rabbit does' production.

Traits	Feeding		SE	Prob.
	BB	BG		
AI/kindling	1.18	1.17	0.02	0.957
Body weight of does, g				
at kindling	4154	4121	18.0	0.234
at 35 d	4610	4530	17.4	0.016
Litter size				
total	8.97	8.98	0.12	0.832
born alive	8.49	8.60	0.11	0.801
at 21 d	8.18	8.12	0.06	0.668
at 35 d	8.07	8.08	0.06	0.702
Litter weight, g at birth (before standardization)	538	551	6.48	0.406
at 21 d	3239	3206	29.3	0.186
at 35 d	8160	7834	69.2	0.001
Individual weight of kits, g				
at birth	64.7	65.0	0.46	0.793
at 21 d	397	393	2.51	0.364
at 35 d	1006	964	5.04	<0.001
Mortality of kits, %				
0-21	3.2	4.0		0.216
21-35	1.2	0.5		0.144
Feed intake of does and their litters, g/day				
0-21	413	414	2.85	0.805
21-35	683	668	4.35	0.069
TOBEC, E-value of kindled does	1922	1957	24.3	0.024
Doe survival, %	73.3	84.7		0.096

The does body weight was lower (P=0.016) at 35 days in the BG group. In the present analysis the feed intake of does and their litters was not different during the first three weeks of lactation until they received the same diet, but the BG rabbits consumed slightly less between the days 21 and 35 (P=0.069). The negative effects of the sudden diet change during lactation was described by several authors (Debray *et al.*, 2002, Gidenne and Fortun-Lamothe, 2002) who found lower feed consumption and, as a consequence, lower doe body weight and milk production and lower kits body weight. This finding was also supported by our results as lower individual and litter weights were recorded at the age of 35 days in the BG group (P<0.001) compared to the BB rabbits. The differences in the energy content of the diets also accounted for these results (Maertens and De Groote, 1988; Fortun-Lamothe, 1997; Pascual *et al.*, 1999). The feeding regime had no effect on the number of AI/kindling, litter size and suckling mortality. The lower body weight of BG does at weaning did not influence the reproductive performance, although the BB does showed a better body condition

(TOBEC E-value) at parturition compared to the BG does (P=0.024). The rabbit does in both groups were fed with the lactation diet after weaning. This may have resulted in a better condition of the BG rabbits at kindling. The BG does showed slightly better survival, but the difference between the groups was significant only at 0.1% level. At 5 and 7 weeks of age, rabbits were heavier in the BB group (P<0.001 and P=0.008). After weaning (between the 5th and 7th weeks), because of the change of the diet, the feed consumption of the BB group was lower (P=0.020) which resulted in a slight difference (P=0.077) of the body weight gain (between the 7th and 9th week) in favour of the BG group. The body weights at 9 and 11 weeks were similar (data not reported in the table). No significant difference was obtained for the mortality between the groups.
Comparing the two feeding programs, feeding both the rabbit does and their kits with the lactation diet until weaning is more advantageous then using a post-weaning diet from 21 days to weaning.

Financial help of TECH_08_A3/2-2008-0384 (OM-00198/2008) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

Debray, L., Fortun-Lamothe, L., Gidenne, T., 2002. Influence of low starch/fibre ratio around weaning on intake behaviour, performance and health status of young and rabbit does. Anim. Res. 51:63-75.

EM-SCAN Inc., 1996. EM-SCAN model 3000 operator's manual. EM-SCAN Inc., Springfield, Illionis.

Fortun-Lamothe, L., 1997. Effect of dietary fat on reproductive performance of rabbit does: A review. World Rabbit Sci. 5:33-38.

Fortun-Lamothe, L., Gidenne, T., 2003. Besoins nutritionnels du lapereau et stratégies d'alimentation autour du sevrage. INRA Prod. Anim. 16:39-47.

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

Lebas, F., 2004. Reflections on rabbit nutrition with special emphasis on feed ingredients utilization. In: Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, pp. 686-736.

Maertens, L., De Groote, G., 1988. The influence of the dietary energy content on the performance of post-partum breeding does. In: Proc. 4th World Rabbit Congress, Budapest, Hungary, 3:42-52.

Pascual, J.J., Tolosa, C., Cervera, C., Blas, E., Fernández-Carmona, J., 1999. Effects of diets with different digestible content on the performance of rabbit does. Anim. Feed Sci. Technol. 81:105-117.

EFFECT OF RE-INSEMINATION INTERVAL AFTER THE FIRST PARTURITION ON THE PERFORMANCE OF RABBIT DOES

MATICS ZS.[1], KUSTOS K.[3], GERENCSÉR ZS.[2], RADNAI I.[2], NAGY I.[2], SZENDRŐ ZS.[2]

[1]*K1HAS-ORG, Research Group of Animal Breeding and Hygiene, Kaposvár, Hungary*
[2]*Faculty of Animal Science, Kaposvár University, Hungary*
[3]*Lab-Nyúl Ltd., Gödöllõ, Hungary*
Zsolt Matics, Kaposvár University, H-7400 Kaposvár Guba S. Str. 40, Hungary
Tel. +36 82-505 800 - Fax: +36 82-320 167
*Corresponding author: matics.zsolt@ke.hu

ABSTRACT

The objective of the study was to examine the effect of the length of period between the first kindling and the next insemination on the performance of rabbit does. Rabbit does (n=311) were randomly sorted to 3 groups and were inseminated 11 (AI-11), 18 (AI-18) or 25 days (AI-25) after the first parturition. Subsequent inseminations occurred 11 days after kindling. The kindling rates (between the 2nd and 7th kindling) of the AI-11, AI-18 and AI-25 groups were 68.0; 74.1 and 76.3 (NS), respectively. No significant differences were found for the does' body weight, litter size (total, born alive, at day 21), suckling mortality, litter and individual weight at day 21. Despite of the small differences that were recorded for these traits, the productivity per 100 inseminations substantial alterations were observed for the total number of kits born (687, 738 and 786), total number of kits born alive (642, 705 and 724), total number of kits at day 21 (642, 705 and 724) and total kit's weight at day 21 (221, 230 and 239 kg) among the AI-11, AI-18 and AI-25 groups. Based on the results after the first kindling it is worth to re-inseminate the does 1-2 weeks later for improving their condition and production level.

Key words: Rabbit does, Reproductive performance, Insemination interval.

INTRODUCTION

The most important factors that determines the rabbit does' production is their body condition (Pascual, 2010), and the age at first insemination (Rommers *et al.*, 2002; Bonanno *et al.*, 2004). High longevity and high level production can only be expected if the energy depots of rabbit does is sufficient. During the final phase of gestation that coincides with the lactation peak the does show energy deficit (Xiccato, 1996), thus feed intake cannot provide them with their energy demand. The primiparous lactating does loose an exceptionally large part of their fat depots that can be explained with the growth of their own body as they inseminated after reaching 75-

80% of their adult weight. The does condition is the most critical after the first kindling therefore in the present study the authors examined the effect of the length of the period between the first kindling and the next insemination (day 11, 18 and 25) on the does' production.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted at the rabbit farm of the Labnyúl Ltd using 311 Pannon White rabbit does. The does were housed in cages having a basic area of 90x40 cm. The temperature ranged between 15 and 28°C depending on the season. The does were mated first at age of 16.5 weeks. Generally 10 hour lighting period was applied which was increased to 16 hours 8 days prior to insemination with the aim of biostimulation. At the time of kindling the does were intramuscular injected 0.2 ml Receptal (GnRH analogue). The rabbit does were randomly sorted into three groups and were inseminated 11, 18 or 21 days following their first kindling (AI-11, n=101; AI-18, n=109; AI-25, n=101). Afterwards all does were inseminated at day 11 after kindling. The size of the litters was equalized: the maximum number of kits per litter was 10. Productive traits were evaluated by means of multifactor ANOVA, kindling rate and suckling mortality was analyzed by chi-square test. The period until re-insemination was considered as fixed effect while the parity was treated as a random factor. In the evaluation the first kindlings were not considered because they were independent of the time of re-insemination. Statistical analyses were conducted using SPSS 10.0 software package.

RESULTS AND CONCLUSIONS

Results are summarized in Table 1.
The average kindling rate between the 2nd and the 7th parturitions of the AI-11, AI-18 and AI-25 groups were 68.0, 74.1 and 76.3%, respectively. The results justify both the short and long term favourable effects of the longer period applied after the first parturition on the kindling rate. The body weight of the AI-25 does were slightly higher than that of the other groups but the differences were not significant. No differences were found for litter size among the groups. Suckling mortality showed significant differences at the 2nd and 5th kindlings but pooling the results for all kindlings the differences among the groups were small. No significant differences were found for individual and litter weight at day 21. Other authors (Xiccato *et al.*, 2005; Castellini *et al.*, 2006; Feugier and Fortun-Lamothe, 2006; Szendrő *et al.*, 2008) conducted several experiments where the insemination at day 11 was compared to a more extensive reproduction rhythm. In these experiments the period between kindling and re-insemination was different throughout the whole productive period contrary to the present study where the difference was confined to the first kindling. In these abovementioned experiments the authors observed that in the extensive groups the body weight of the does increased, the condition and kindling rate improved but the litter

size generally did not alter. Contrary to these favourable results the annual production decreased. In our study the longer period was only applied after the first kindling that could be compensated by the does during the latter production phase. The observed small differences among the groups can be summed into the total production per 100 inseminations. Using this parameter the superiority of the AI-25 group over the AI-11 group was obvious. The observed substantial differences between these groups were 14.4, 12.8, 14.1 and 8.1% for total number of born kits, number of kits born alive, number of kits alive at day 21 and litter weight at day 21 ($P<0.05$). Thus it can be concluded that applying a lengthened period after the first kindling (by 1 or 2 weeks) had a favourable effect on the does' production.

Financial help of TECH_08_A3/2-2008-0384 (OM-00198/2008) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

Bonanno, A., Mazza, F., Di Grigoli, A., Alicata, M.L., 2004. Effects of restricted feeding during rearing, combined with a delayed first insemination, on reproductive activity of rabbit does. In: Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, pp. 224-230.

Castellini, C., Dal Bosco, A., Cardinali, R., 2006. Long term effect of post-weaning rhythm on the body fat and performance of rabbit doe. Reprod. Nutr. Dev. 46:195-204.

Feugier, A., Fortun-Lamothe, L., 2006. Extensive reproductive rhytm and early weaning improve body condition and fertility of rabbit does. Anim. Res. 55:459-470.

Pascual, J.J., 2010. The role of body condition on new feeding and breeding programmes for reproductive rabbit does. 22. Nyúltenyésztési Tudományos Nap, Kaposvár, pp. 11-32.

Rommers, J.M., Meijerhof, R., Noordhuizen, J.P.T.M., Kemp, B., 2002. Relationships between body weight at first mating and subsequent body development, feed intake and reproductive performance of rabbit does. J. Anim. Sci. 80:2036-2042.

Szendrő, Zs., Gerencsér, Zs., Matics, Zs., Biróné Németh, E., Nagy, I., 2008. Comparison of two reproductive rhythms of rabbit does. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 455-458.

Xiccato, G., 1996. Nutrition of lactating does. In: Proc. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, France, 1:29-47.

Xiccato, G., Trocino, A., Boiti, C., Brecchia, G. 2005. Reproductive rhythm and litter weaning age as they affect rabbit doe performance and body balance. Anim. Sci. 81:289-296.

Table 1 – Effect of time of insemination after first parturition on the performances of does.

Parturition	Groups (re-insemination, days)			SE
	11	18	25	
Kindling rate, %				
2	54.5b	62.8a	66.2a	-
2-7	**68.0**	**74.1**	**76.3**	**-**
Body weight of does, kg				
2	4.18	4.20	4.26	0.02
2-7	**4.27**	**4.27**	**4.34**	**0.02**
Litter size, total				
2	8.3	8.2	9.1	0.19
2-7	**10.1**	**10.0**	**10.3**	**0.14**
Litter size, alive				
2	8.1	7.8	8.7	0.19
2-7	**9.45**	**9.51**	**9.49**	**0.08**
Litter size at 21d				
2	7.00	7.17	7.47	0.12
2-7	**7.41**	**7.46**	**7.53**	**0.10**
Suckling mortality, %				
2	7.5ab	5.9a	9.0b	-
2-7	**10.1**	**12.2**	**10.9**	**-**
Litter weight at 21 d, kg				
2	2.94	3.05	3.02	0.04
2-7	**3.11**	**3.11**	**3.13**	**0.04**
Individual weight at 21 d, g				
2	436ab	438b	411a	4.6
2-7	**429**	**427**	**424**	**3.6**
Per 100 AI				
number of kits born	689a	738b	785c	10.5
number of kits, alive	643	704	724	9.77
number of kits at 21d	504a	553b	575b	6.93
total weight at 21d	211a	230b	239b	2.57

a-c: Different letters within a row show significant differences (P<0.05)

CT-BASED SELECTION FOR IMPROVING THE CARCASS TRAITS OF GROWING RABBITS

SZENDRŐ ZS.[1], MATICS ZS.[2], GERENCSÉR ZS.[1], RADNAI I.[1], NAGY I.[1]

[1]*Faculty of Animal Science, Kaposvár University, Hungary*
[2]*HAS-ORG, Research Group of Animal Breeding and Hygiene, Kaposvár, Hungary*
Zsolt Szendrő, Kaposvár University, H-7400 Kaposvár Guba S. str. 40., Hungary
Tel. +36 82-505-800 - Fax: +36 82-320-167
*Corresponding author: szendro.zsolt@ke.hu

ABSTRACT

The objective of the paper was to summarize the main results of selection based on data of computer tomography (CT). Pannon White growing rabbits were selected for L-value (the average of surface *of m. Longissimus dorsi* between the 2nd and 3rd , and 4th and 5th lumbar vertebrae) between 1992 and 2003. Since 2004 the selection criteria is the volume of thigh muscle. The effectiveness of both methods was proven by estimating the genetic trend, using divergent selection and comparing different breeds/lines with Pannon White rabbits. The increased performance (larger amount of meat in the carcass) of the selected animals gives an extra profit for slaughterhouses.

Key words: Growing rabbit, Selection, CT, Carcass traits.

INTRODUCTION

The main directions of rabbit selection for productivity aim to improve either the prolificacy in maternal lines or growth rate in terminal lines. Improving the carcass traits has not been among the selection goal. The advanced technology existing at the Kaposvár University provides the possibility of using computerised tomography (CT) for selecting carcass traits of growing rabbits. One of the selection criteria of Pannon White rabbits was the surface of *Longissimus dorsi* muscle (MLD) between 1992 and 2003, and the volume of thigh muscle (VTM) since 2004.
In this paper we summarise the main results of the CT based selection on carcass traits of Pannon White rabbits.

MATERIALS AND METHODS

The selection has been performed at Kaposvár University on Pannon White rabbits since 1992. The first step of the selection was based on the growth rate between 5

and 10 weeks and the rabbits showing the best weight gain were examined by CT at the age of 10.5 weeks.
In case of L-value on the topogram the anatomical points of the CT scans were marked on the junction of the 2nd and 3rd, and 4th and 5th lumbar vertebrae. L-value is the average of the surface of MLD measured on the two locations.
In case of volume of thigh muscle (VTM) 11-12 CT scans were taken every 10 mm between *crista iliaca* of *os ilium* and patella. Summing the measurements on scans the VTM was determined.

RESULTS AND CONCLUSIONS

Before beginning the selection the connection between CT based parameters and carcass traits was estimated. The closest correlations were found between the L-value and dressing out percentage (DoP) and the ratio of mid part of the carcass (r=0.53-0.65 and 0.67-0.71, resp.) (Szendrő *et al.*, 1992).
The estimated h^2 of L-value was 0.41, the genetic correlation between L-value and DoP was 0.45 and the genetic trend was between 0.12 and 0.78 cm^2 (1.7% yearly genetic improvement) (Szendrő *et al.*, 2004).
In the divergent selection experiment only male rabbits were selected. The weight of mid part of carcass (452 and 430g, P<0.05) and the DoP (64.1 and 62.3%, P<0.05) were significantly higher in the second generation of plus selected group than that of the first generation of minus selected rabbits (Szendrő *et al.*, 1996).
Comparing crossbred Pannon White (P) rabbits with different terminal hybrid line rabbits (Hycole and Zika) the ratio of MLD to the carcass (11.2, 10.8 and 10.5%) was the highest in rabbits originated from P males (Metzger *et al.*, 1996a). Similar results were published when the genotypes of P and Hycole were compared (Metzger *et al.*, 1996b).
All of the results proved that the selection based on L-value was effective.
In 2004 the selection criteria was changed to volume of tight muscle (measured by CT).
The phenotypic correlation between VTM and weight of hind leg and DoP were 0.77 and 0.45, resp. (Nagy *et al.*, 2009). The estimated value of h^2 of VTM varied between 0.19 and 0.33 (Nagy *et al.*, 2005, 2010; Gyovai *et al.*, 2008). The selection response was 4cm^3 per year (Gyovai *et al.*, 2008).
Comparing the second generation of divergently selected rabbits, the more selected animals reached higher values in proportion of hind leg to the carcass (38.2 and 36.3%, P<0.001), and DoP (59.8 and 57.8, P=0.086) and lower values in gastrointestinal tract (16.7 and 18.1%, P<0.05), ratio of fore part to the carcass (29.4 and 30.1%, P<0.05) and ratio of perirenal fat (1.90 and 2.40%, P<0.01) (Szendrő *et al.*, 2008).
Carcass traits of different crossing combinations using P, Maternal line (M) as dams and P, M, Large body line (L), Terminal line of Hycole (H) as sires were compared. P dams and P sires had positive effect on DoP, ratio of hind part and percentage of MLD but opposite tendencies were observed in ratio of fort part and perirenal fat (Szendrő *et al.*, 2010). In another experiment the purebred P, M and L genotypes

were compared. The highest values in DoP (61.3, 60.2 and 61.1%) and ratio of hind part (38.2, 37.3 and 37.2%) but lowest values in ratio of perirenal fat (1.92, 2.16 and 1.99%), were observed in P rabbits (Szendrő *et al.*, 2009).
It has to be underlined that in the last two experiments (Szendrő *et al.*, 2009, 2010) the large type (paternal) line achieved similar DoP than P rabbits because the L line has also been selected for VTM since 2005.
All of the results proved that the CT based selection for volume of thigh muscle is effective to improve one of the most valuable parts (hind leg) of the carcass.
The CT based selection provides a high economical benefit for the slaughterhouses. According to our calculation using the data of the experiments (Metzger *et al.*, 1996a; Szendrő *et al.*, 2006, 2010) the price of different part of the carcass and similar price for purchased rabbits, the higher amount of meat in the carcass result an increase profit for the slaughterhouse. Calculating with 1 million rabbits per year the extra income is about 350,000-370,000 Euros (Mikó *et al.*, 2010).

The experiments were partly sponsored by TECH_08_A3/2-2008-0384 (OM-00198/2008).

REFERENCES

Gyovai, P., Nagy, I., Gerencsér, Zs., Metzger, Sz., Radnai, I., Szendrő, Zs., 2008. Genetic parameters and trends of the thigh muscle volume in Pannon White rabbits. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 115-119.

Metzger, Sz., Odermatt, M., Szendrő, Zs., Mohaupt, M., Romvári, R., Makai, A., Bíró-Németh, E., Sipos, L., Radnai, I., Horn, P., 2006a. A study of the carcass traits of different rabbit genotypes. World Rabbit Sci. 14:107-114.

Metzger, Sz., Odermatt, M., Szendrő, Zs., Mohaupt, M., Romvári, R., Makai, A., Biró-Németh, E., Radnai, I., Sipos, L., 2006b. Comparison of carcass traits and meat quality of Hyplus hybrid, purebred Pannon White and their crossbreds. Archiv. Tier. 49:389-399.

Mikó, A., Radnai, I., Gerencsér, Zs., Matics, Zs., Nagy, I., Szendrő, K., Szendrő, Zs., 2010. The profit of slaughter houses realized in the course of CT-aided selection. In: Proc. 22nd Hung. Conf. Rabbit Prod., Kaposvár, Hungary, pp. 119-124.

Nagy, I., Metzger, Sz., Gyovai, M., Vígh, Zs., Romvári, R., Petrási, Zs., Szendrő, Zs., 2005. Genetic parameters of thigh muscle volume estimated in Pannon White rabbit population using computer tomography. In: Proc. 17th Hung. Conf. Rabbit Prod., Kaposvár, Hungary, pp. 25-28.

Nagy, I., Gyovai, P., Gerencsér, Zs., Matics, Zs., Radnai, I., Bíróné Németh, E., Szendrő, Zs., 2009. Genetic parameters of carcass traits in Pannon White rabbit population. In: Proc. 21st Hung. Conf. Rabbit Prod., Kaposvár, Hungary, pp. 73-77.

Nagy, I., Gyovai, P., Radnai, I., Matics, Zs., Gerencsér, Zs., Donkó, T., Nagyné Kiszlinger, H., Szendrő, Zs., 2010. Genetic parameters of growth in vivo CT based and slaughter traits in Pannon White rabbits. In: Proc. 22nd Hung. Conf. Rabbit Prod., Kaposvár, Hungary, pp. 115-117.

Szendrő, Zs., Horn, P., Kövér, Gy., Berényi, E., Radnai, I., Bíró-Németh, E., 1992. In vivo measurement of carcass traits of meat type rabbits by X-ray computerised tomography. J. Appl. Rabbit Res. 15:799-809.

Szendrő, Zs., Romvári, R., Horn, P., Radnai, I., Bíró-Németh, E., Milisits, G., 1996. Two-way selection for carcass traits by computerised tomography. In: Proc. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, France, 2:371-375.

Szendrő, Zs., Romvári, R., Nagy, I., Andrássy-Baka, G., Metzger, Sz., Radnai, I., Bíró-Németh, E., Szabó, A., Vígh, Zs., Horn, P., 2004. Selection of Pannon White rabbits based on computer tomography. In: Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, pp. 175-180.

Szendrő, Zs., Metzger, Sz., Romvári, R., Szabó, A., Locsmándi, L., Petrási, Zs., Nagy, I., Nagy, Z., Bíró-Németh, E., Radnai, I., Matics, Zs., Horn, P., 2008. Effect of divergent selection based on CT measured hind leg muscle volume on productive and carcass traits of rabbits. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 249-253.

Szendrő, Zs., Matcs, Zs., Gerencsér, Zs., Radnai, I., Lengyel, M., Nagy, I., Riovanto, R., Dalle Zotte, A., 2009. Effect of adult weight and CT based selection on carcass traits of growing rabbits. Ital. J. Anim. Sci. 8(Suppl. 3):240-242.

Szendrő, Zs., Matics, Zs., Gerencsér, Zs., Nagy, I., Lengyel, M., Horn, P., Dalle Zotte, A., 2010. Effect of dam and sire genotypes on productive and carcass traits of rabbits. J. Anim. Sci. 88:533-543.

EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI LICOPENE SULLA QUALITÀ DEL SEME DI CONIGLIO: RISULTATI PRELIMINARI

TOSCHI I.[1], MANGIAGALLI M.G.[1], CESARI V.[1], LUZI F.[1], CEROLINI S.[2], MARELLI S.[1]

[1]*Dipartimento di Scienze Animali, Università di Milano, Italy*
[2]*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Università di Milano, Italy*
Ivan Toschi, Dipartimento di Scienze Animali, Università di Milano, Via Celoria 2,
20133 Milano (MI), Italy - Tel. +39 02 50316447 - Fax: +39 02 50316434
*Corresponding author: ivan.toschi@unimi.it

ABSTRACT

Preliminary results: effect of lycopene administration on semen quality of rabbit.

A total of 18 hybrid strain Martini male rabbits were randomly divided into three experimental groups. The animals of the first and the second group drank water with 0.1 (group A) and 0.5 (group B) g/l of lycopene addition (A and B groups, respectively), while water without any supplementation was administered to the rabbits of the control group (C), 8 weeks treatment. Semen was collected from 18 bucks (6 animals/group) for 5 consecutive weeks. Ejaculate volume was determined by graduated test-tube and sperm concentration was calculated by Neubauer chamber. Sperm motility was evaluated subjectively by a phase contrast microscope. FPM was scored 1÷4 (low-high). Sperm viability was assessed by nigrosin/eosin (N/E) staining procedure. Data reported showed that the highest level of lycopene (group B) resulted in a significantly greater volume of ejaculate and total number of sperm than in the control group (0.98 *vs*. 0.78 ml, $P<0.05$; 364 *vs*. 227, $P<0.01$), while sperm concentration was not affected. The lycopene addition, however, did not significantly influence progression parameters immediately measured after sampling (t=0h). These preliminary results underline the positive effects of lycopene supplementation on ejaculate volume and sperm number. Further investigations are needed on the role of this antioxidant which could have interesting applications in field conditions.

Key words: Lycopene, Antioxidants, Semen quality, Rabbit bucks.

INTRODUZIONE

Lo stress ossidativo è considerato uno dei principali fattori che contribuiscono a influenzare negativamente la qualità del materiale seminale e a ridurre la fertilità sia nell'uomo, sia negli animali (Baker *et al*., 1996; Aitken *et al*., 2003). La membrana dello spermatozoo è caratterizzata da un'elevata presenza di acidi grassi polinsaturi che determina uno spiccato aumento della sua suscettibilità all'ossidazione e che suggerisce l'opportunità di utilizzare molecole ad azione antiossidante per contra-

stare i fenomeni di perossidazione lipidica (Agarwal *et al*., 2004). L'azione antiossidante del licopene, pigmento carotenoide di origine naturale presente in molti vegetali quali pomodoro, pompelmo rosa, papaya e anguria, è stato recentemente studiato negli uccelli, nel ratto e nell'uomo (Martino *et al*., 2006; Turk *et al*., 2007; Goyal *et al*., 2007). In quest'ultimo, in particolare, è stato evidenziato che ad una inferiore ingestione di licopene con la dieta è associata una minore qualità del materiale seminale (Mendiola *et al*., 2010). Nel gallo, Mangiagalli *et al.* (2010) hanno evidenziato effetti positivi dell'addizione di licopene sia sulle caratteristiche qualitative del materiale seminale, sia sulla fertilità. Lo scopo del presente lavoro è stato quindi quello di valutare l'effetto della somministrazione di licopene sulle caratteristiche qualitative del materiale seminale di coniglio.

MATERIALI E METODI

La prova è stata condotta su 18 maschi ibridi Martini stabulati in gabbie individuali e alimentati *ad libitum* con un mangime commerciale (16,2 % PG e 10,7 MJ/kg ED). Dopo un congruo periodo di adattamento al prelievo del seme, i conigli sono stati suddivisi in 3 gruppi (6 animali/gruppo) ai quali sono stati somministrate, per un periodo di 8 settimane, 3 differenti concentrazioni di Lycopene 10% WS (Roche Vitamins, Base, Switzerland) nell'acqua di bevanda (gruppo A: 0,1 g/l di licopene; gruppo B: 0,5 g/l di licopene; gruppo C: assenza di licopene). La raccolta del seme (2 eiaculati/maschio con 15 minuti di intervallo tra i due successivi prelievi) è stata effettuata con frequenza bisettimanale. La qualità del materiale seminale, in termini di volume, concentrazione, motilità e vitalità degli spermatozoi, è stata valutata per 5 settimane consecutive su tutti gli animali in prova (36 settimane di età al momento della prima raccolta). Il volume e la concentrazione sono stati determinati, rispettivamente, mediante provetta graduata e camera di conta Neubauer, mentre la motilità e le classi di motilità (punteggio da 1 a 4) sono state valutate al microscopio ottico (20x; T = 37°C) utilizzando la camera di Makler. La vitalità è stata determinata utilizzando la procedura di colorazione Eosina/Nigrosina.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Dai dati riportati in tabella 1 si può evincere come il livello più elevato di licopene abbia determinato un volume dell'eiaculato e un numero totale di spermatozoi significativamente maggiori rispetto a quelli del gruppo di controllo (0,98 *vs*. 0,78 ml, P<0,05; 364 *vs*. 227, P<0,01; rispettivamente per il gruppo B e C), ma non differenti da quelli determinati sugli eiaculati degli animali trattati con il livello intermedio di licopene.

Tabella 1 – Effetto della somministrazione di licopene sulle caratteristiche del seme di coniglio (6 animali/gruppo).

	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C
Volume, ml	0,84 ± 0,05[a,b]	0,98 ± 0,05[a]	0,78 ± 0,05[b]
Concentrazione, n*10^6/ml	329 ± 28,7	359 ± 28,7	278 ± 28,7
Numero totale di spermatozoi	285 ± 32,0[A,B]	364 ± 32,0[A]	227 ± 1,91[B]

Media ± E.S. [A,B]: P < 0,01; [a,b]: P < 0,05.

Al significativo aumento del volume e del numero degli spermatozoi, però, non è corrisposto un incremento significativo della concentrazione del materiale seminale, differentemente da quanto rilevato nel gallo da Mangiagalli *et al*. (2010). In assoluto, il volume determinato nei tre gruppi sperimentali è risultato superiore ai valori riportati in bibliografia (Castellini *et al*., 1999; 2003), a differenza di quanto rilevato per i dati relativi alla concentrazione del seme che è risultata sempre inferiore, in tutti e 3 i gruppi, ai valori riportati nei lavori precedentemente menzionati e da Nizza *et al*. (2002). Il livello di addizione del licopene all'acqua, inoltre, non ha determinato effetti significativi sulle caratteristiche cinetiche del materiale seminale (Tabella 2) valutato al tempo zero (t=0h). Nel complesso, la motilità ha fatto registrare valori inferiori a quelli determinati nel coniglio da altri autori (Nizza *et al*., 2002), che hanno riportato percentuali di cellule motili prossime al 70%.

Tabella 2 – Effetto della somministrazione di licopene sulle caratteristiche cinetiche del materiale seminale (6 animali/gruppo).

	C	A	B
Motilità (t=0h), %	54,2±2,30	60,0±2,30	57,8±2,30
FPM (t=0h)	1,96±0,09	2,20±0,09	2,14±0,09
Vitalità (t=0h), %	70,7±1,85	74,3±1,80	74,8±1,80

Media ± E.S. FPM: Forward Progression Motility.

La FPM del seme fresco ha presentato valori analoghi a quelli rinvenibili in letteratura e non influenzati dal livello di addizione dell'antiossidante, che non ha determinato variazioni significative neanche sulla vitalità, a differenza di quanto evidenziato nel gallo da Mangiagalli *et al*. (2010). I primi risultati della presente sperimentazione hanno messo quindi in evidenza come l'addizione di livelli crescenti di licopene all'acqua di bevanda non influenzi le caratteristiche qualitative del materiale seminale fresco, ma determini un volume dell'eiaculato e un numero totale di spermatozoi più elevato. L'elevata variabilità osservata nei tre gruppi, però, suggerisce la necessità di ricorrere ad un numero maggiore di animali, al fine di meglio indagare gli effetti di questo antiossidante sulle caratteristiche qualitative del seme di coniglio.

BIBLIOGRAFIA

Agarwal, A., Nallella, K.P., Allamaneni, S.R, Said, T.M., 2004. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reprod. BioMedicine Online 8:616-627.

Aitken, R.J., Baker, M.A., Sawyer, D., 2003. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male fertility and genetic disease. Reprod. BioMedicine Online 7:65-70.

Baker, H.W., Brindle, J., Irvine, D.S., Aitken, R.J., 1996. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. Fertil. Steril. 65:411-419.

Castellini, C., Lattaioli, P., Bernardini, M., 1999. Effect of dietary supplementation with α-tocopheryl acetate and ascorbic acid on qualitative characteristics and fertilizing ability of rabbit semes. World Rabbit Sci. 7:217-220.

Castellini, C., Lattaioli, P., Dal Bosco, A., Minelli, A., Mugnai, C., 2003. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin E, C and n-3 fatty acids. Repr. Nutr. Dev. 43:91-103.

Goyal, A., Chopra, M., Lwaleed, B.A., Birch, B., Cooper, A.J., 2007. The effects of dietary lycopene supplementation on human seminal plasma. Bju International 99:1456-1460.

Mangiagalli, M.G., Martino, P.A., Smajlovic, T., Cavalchini, G.L., Marelli, S.P., 2010. Effect of lycopene on semen quality, fertility and native immunity of broiler breeder. British Poultry Science 51:152-157.

Martino, P.A., Mangiagalli, M.G., Marelli, S.P., Smajlovic, T., Cavalchini, G.L., 2006. Effect of lycopene on semen bacteriological status and native immunity in roosters. In: Proc. XII European Poultry Conference, Verona, Italy, p. 62.

Mendiola, J., Torres-Cantero, A.M., Vioque, J., Moreno-Grau, J.M., Ten, J., Roca, M., Moreno-Grau, S., Bernabeu, R., 2010. A low intake of antioxidant nutrients is associated with poor semen quality in patients attending fertility clinics. Fertil. Steril. 93:1128-1133.

Nizza, A., Di Meo, C., Taranto, S., Stanco, G., 2002. Effect of collection frequency on rabbit semen production. World Rabbit Sci. 10:49-52.

Turk, G., Atessahin, A., Sonmez, M., Yuce, A., Ceribasi, A.O., 2007. Lycopene protects against cyclosporin A induced testicular toxicity in rats. Theriogenology 67:778-785.

Sessione Nutrizione e Fisiologia

EFFETTO DEI MANNANOLIGASACCARIDI SULLE PERFORMANCE DI ACCRESCIMENTO DEL CONIGLIO

BOVERA F., IANNACCONE F., DI MEO C., PICCOLO G., NIZZA A.

Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti, Università di Napoli Federico II, Italy
Fulvia Bovera, Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti,
Università di Napoli Federico II, Via F. Delpino 1, 80137 Napoli, Italy
Tel. +39 081 2536497 - Fax: +39 081 292981
*Corresponding author: bovera@unina.it

ABSTRACT

Effect of mannanoligosaccharides on performance of growing rabbit

A total of 256 weaned (34 d) rabbits were equally divided in 4 groups fed the same basal diet supplemented with antibiotics (ANT), mannanoligosaccharides at 1.0 and 1.5 g/kg diet (MOS_1.0 and 1.5) and without supplements (CONT). Up to 67 days, live weight and feed intake were recorded weekly in order to calculate body weight gain (BWG) and feed conversion ratio (FCR). Mortality rate was recorded daily. No differences were recorded among groups for mortality rate. ANT and MOS_1.0 groups had the highest body weight at 67 days ($P<0.05$) due to a high BWG. However, feed intake and FCR resulted significantly lower ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively) for MOS_1.0 than ANT group. MOS are a possible alternative to antibiotics with an interesting effect on FCR reduction.

Key words: Mannanoligosaccharides, Rabbit, Antibiotics, Performance.

INTRODUZIONE

Nonostante il divieto all'uso di antibiotici come promotori di crescita imposto dall'UE a partire dal 1 gennaio 2006 (EC Reg. 1831/2003) in coniglicoltura tali additivi vengono ancora inclusi nelle diete del periodo post-svezzamento, dietro prescrizione veterinaria, per la profilassi dell'enterocolite enzootica, tra le prime cause di mortalità nelle aziende cunicole europee (Dewree *et al*., 2003). In vista di norme più restrittive imposte anche per la tutela del benessere animale (Raccomandazioni sul benessere del coniglio domestico, giunte alla 19ª edizione), è sempre più attiva la ricerca di molecole alternative agli antibiotici che possano garantire un adeguato stato sanitario dell'apparato digerente dei conigli in allevamento intensivo. In quest'ottica, crescente attenzione viene rivolta ai mannanoligosaccaridi (Mourao *et al*., 2006; Pinheiro *et al*., 2009; Guedes *et al*., 2009) per la loro capacità di bloccare l'adesione alla parete intestinale di alcuni batteri coinvolti nell'insorgenza di differenti forme di patologia enterica. Scopo del lavoro è stato quello di verificare l'effet-

to dei mannanoligosaccaridi sulle performance di crescita del coniglio in assenza di particolari eventi patologici.

MATERIALI E METODI

La prova è stata condotta in un'azienda cunicola della provincia di Benevento, con anamnesi positiva per enterocolite enzootica, in un periodo dell'anno caratterizzato da condizioni favorevoli di temperatura che hanno contribuito ad assicurare un buon livello igienico-sanitario dell'allevamento. La prova è stata condotta su 256 conigli ottenuti da incroci Bianca di Nuova Zelanda × Californiana. Allo svezzamento (avvenuto a 34 giorni di età) gli animali, alimentati con la medesima dieta (PG 17%, EE 3,5%, NDF 36%, ADL 3,6%) per tutta la durata della prova, fino al 67° giorno di età, sono stati omogeneamente suddivisi in 4 gruppi sperimentali (32 gabbie bicellulari e 64 animali per gruppo). Al gruppo di controllo (CONT) è stata somministrata soltanto la dieta base, mentre nel secondo gruppo sperimentale (ANT) alla dieta base è stata addizionata una medicazione composta da colistina solfato (144 mg/kg), tilosina (100 mg/kg) e ossitetraciclina (1000 mg/kg). Ai gruppi MOS_1.0 e MOS_1.5, invece, è stata somministrata la dieta base a cui sono stati addizionati i mannanoligosaccaridi (Bio-Mos, Alltech Biotechnology, USA) in ragione, rispettivamente, di 1,0 e 1,5 g/kg di alimento. Il peso vivo individuale e il consumo di alimento per mangiatoia (4 conigli per mangiatoia, 16 replicazioni per gruppo) sono stati rilevati settimanalmente, al fine di poter determinare l'Indice di Conversione Alimentare (ICA). In tutto il periodo di prova, la mortalità è stata registrata quotidianamente. I dati sono stati sottoposti ad ANOVA ad una via (SAS, 2000) per testare l'effetto dell'addizione alla dieta dei mannanoligosaccaridi. La differenza tra le mortalità è stata testata mediante il chi-quadro.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Nel corso della prova non si sono verificati eventi patogeni e lo stato sanitario degli animali si è mantenuto buono. La mortalità non ha mostrato differenze significative tra i gruppi e si è attestata mediamente intorno al 7,6 %, confermando che quando non si verificano particolari eventi patogeni e lo stato igienico-sanitario dell'allevamento è adeguato, né gli antibiotici né i mannanoligosaccaridi influenzano la mortalità degli animali, come già evidenziato da altri autori (Bovera *et al*., 2011; Mourao *et al*., 2006). I dati relativi alle mangiatoie delle gabbie nelle quali è morto anche un solo coniglio sono state escluse dall'elaborazione statistica. Per tale motivo, la valutazione degli IPG e degli ICA è stata effettuata elaborando 14, 13, 14 e 12 osservazioni, rispettivamente, per i gruppi MOS_1.0, MOS_1.5, CONT e ANT. In tabella 1 sono riportati i risultati relativi alle performance produttive dei conigli durante l'intero periodo di prova. Partendo da un peso allo svezzamento simile tra i gruppi, a 67 giorni, i conigli dei gruppi ANT e MOS_1.0 sono risultati significativamente ($P<0,05$) più pesanti rispetto a quelli del gruppo controllo. Il gruppo MOS_1.5 non ha mostrato differenze statisticamente significative rispetto agli altri gruppi in pro-

va. Il gruppo ANT ha fatto registrare il più elevato IPG anche se esso non è risultato significativamente diverso rispetto al gruppo che riceveva la dieta addizionata con 1 g/kg di MOS. L'ingestione volontaria di alimento è stata significativamente influenzata (P<0,01) dall'addizione alla dieta dei diversi prodotti, con valori più elevati nel gruppo ANT e più contenuti nel gruppo MOS_1.5.

Tabella 1 – Performance produttive dei conigli dei quattro gruppi nel corso della prova.

	PV34	PV67	IPG34-67	Ing. 34-67	ICA34-67
MOS_1.0	677,3	1699^{ab}	35,59^{AB}	108,7^{BC}	3,14^{b}
MOS_1.5	673,2	1631^{abc}	33,91^{B}	104,5^{C}	3,23^{b}
CONT	671,8	1577^{c}	32,94^{B}	116,5^{B}	3,57^{a}
ANT	680,7	1775^{a}	39,09^{A}	131,9^{A}	3,56^{a}
RMSE	75,01	143,9	2,74	1,81	0,104
P	0,997	0,019	<0,0001	0,004	0,0298

PV: peso vivo, IPG: incremento ponderale giornaliero; Ing: ingestione individuale giornaliera; ICA: indice di conversione alimentare; MOS_1.0 e MOS_1.5: mannanoligosaccaridi a 1,0 e 1,5 g/kg di alimento; CONT: controllo; ANT: antibiotici; RMSE: root mean square error; $^{a-c}$: P < 0,05; $^{A-C}$: P < 0,01.

Di conseguenza, l'ICA relativo all'intero periodo di prova è risultato più favorevole (P<0,05) nei due gruppi alimentati con i MOS, mentre i gruppi controllo e ANT hanno presentato ICA sovrapponibili. Questi risultati sono probabilmente da attribuire ad una migliore digeribilità degli alimenti nei conigli del gruppo MOS_1.0. In diverse prove *in vivo* e *in vitro* condotte utilizzando mannanoligosaccaridi (Bovera *et al*., 2010a; Bovera *et al*., 2010b; Bovera *et al*., 2011), infatti, è stato segnalato che l'impiego dei MOS favorisce una più intensa digestione ciecale soprattutto a carico dei carboidrati strutturali determinando maggiori produzioni di acido acetico rispetto ad animali alimentati senza additivi o con antibiotici. La più efficiente utilizzazione degli alimenti registrata nel corso della prova, quindi, potrebbe dipendere da un miglioramento dello stato sanitario dell'apparato digerente dei conigli determinato dalla presenza dei MOS. Questi, infatti, rappresentando una fonte di carboidrati che, a differenza del glucosio, non possono essere utilizzati dai batteri patogeni quali *C. spiroforme* per la sintesi delle tossine (Boriello e Carman, 1983), potrebbero fungere da "prebiotici" per la flora saprofita, svolgendo al contempo un'importante azione di riduzione della capacità di adesione di alcuni batteri patogeni alla parete intestinale. Sulla base dei risultati ottenuti, i mannanoligosaccaridi, alla dose di 1 g/kg di alimento, sembrano essere una possibile alternativa agli antibiotici.

BIBLIOGRAFIA

Boriello, S.P., Carman, R.J., 1983. Association of iota-like toxin and Clostridium spiroforme with both spontaneous and antibiotic-associated diarrhea and colitis in rabbits. J. Clin. Microb. 17:414-418.

Bovera, F., Nizza, S., Marono, S., Maliardo, K., Piccolo, G., Tudisco, R., de Martino, L., Nizza, A., 2010a. Effect of mannan-oligosaccharides on rabbit performance,

digestibility and rectal bacterial anaerobic populations during an episode of epizootic rabbit enteropathy. World Rabbit Sci. 18:9-16.

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

Bovera, F., Lestingi, A., Marono, S., Iannaccone, F., Nizza, S., Maliardo, K., de Martino, L., Tateo, A., 2011. Effect of dietary mannan-oligosaccharides on in vivo performance, nutrient digestibility and caecal content characteristics of growing rabbits. J. Anim. Phys. Anim. Nutr. in press.

Dewreée, R., Licois, D., Coudert, P., Lassence, C., Vindevogel, H., Marlier, D., 2003. L'entéropathie épizootique du lapin (EEL): étude du rôle des infections par *Clostridium perfringens* dans l'étio-pathogénie de ce syndrome. In: Proc. 10èmes Jour. Rech. Cun. Paris, France, pp. 251-254.

EC Council, 2003. Regulation on additives for use in animal nutrition. No. 1831/2003/EC 22 September 2003. Official Journal of European Community, L 268/29.

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.

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

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

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

EFFECT OF SUGAR BEET PULP FIBRE FRACTIONS ON GROWTH PERFORMANCE, FECAL DIGESTIBILITY AND DIGESTIVE PHYSIOLOGY IN RABBITS AROUND WEANING

EL ABED N.[1], DELGADO R.[1], ABAD R.[1], ROMERO C.[1], FERNANDEZ A.[2], VILLAMIDE M.J.[1], MENOYO D.[1], GARCÍA J.[1], CARABAÑO R.[1]

[1]*Departmento Produccion Animal, Universidad Politécnica de Madrid, Spain*
[2]*Poultry and Rabbit Research Center, Nutreco, Toledo, Spain*
Rosa Carabaño, Departamento de Producción Animal, ETSI Agrónomos, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain - Tel. +34 91452 4859
*Corresponding author: rosa.carabano@upm.es

ABSTRACT

The present study investigated the effect of the different fibre components of sugar beet pulp (SBP) on growth performance and some digestive traits. Four semi-synthetic diets were formulated with similar NDF (33% DM) and protein (16% DM) level. Control diet was formulated to contain the lowest level of soluble fibre (3% DM) and SBP diet the highest (9%). The soluble (pectins) and insoluble fractions of SBP were studied in other two diets (Pectin and InsSBP diets). A total of 136 weanling rabbits (25 d of age) was housed individually, randomly assigned to 4 experimental groups, and fed *ad libitum* with the experimental diets during 10 days after weaning. The type of diet did not affect growth rate and stomach pH. Animals fed with SBP diet showed higher DM and NDF digestibility (4 and 83%, respectively), gain:feed ratio (13%), cecal and total tract weight (13 and 9%) and ileal viscosity (148%) than rabbits fed the Control diet, but lower cecal pH (9%). Pectin diet increased ileal viscosity and decreased the weight of stomach content with respect to SBP diet. Rabbits fed InsSBP diet showed similar results to SBP diet but lower ileal viscosity and cecal pH than those fed Pectin diet. In conclusion, SBP and their soluble and insoluble fractions are well digested in young rabbits. However the soluble and insoluble fibre of SBP produce different effects in the gastrointestinal tract.

Key words: Soluble fibre, Young rabbits, Viscosity, Digestive traits.

INTRODUCTION

The soluble fibre (SF) may be considered as a functional nutrient in rabbit diets as it promotes changes in intestinal microbiota and gut barrier and it decreases mortality (Carabaño *et al*., 2008; Xiccato *et al*., 2011). However, the mechanism by which SF regulates these effects is not clear. In rabbit diets, sugar beet pulp (rich in pectins) is the preferred raw material to increase dietary SF level. However, the physical and

chemical complexity of soluble polysaccharides and their interactions with other components of the diet make is difficult to define or isolate the single effects of SF components. In consequence, the aim of this work was to investigate the effect of the different fibre fractions (soluble and insoluble) of sugar beet pulp (SBP) on growth performance and at the gastro-intestinal tract level.

MATERIALS AND METHODS

Four semi-synthetic diets were formulated with similar level of NDF (33% DM) and crude protein (16% DM). Control and SBP diets were formulated to contain two levels of SF (3 and 9% DM). The soluble (pectins, Betapec RU 301) and insoluble fractions of SBP (obtained by washing SBP in hot water with NDF solution) were studied by substituting starch or insoluble fibre in the Control diet and obtaining Pectin and InsSBP diets, respectively (Table 1). A total of 136 weanling rabbits of both sexes was blocked by litter at 25 d of age (LW 445±79 g) and randomly assigned to the 4 experimental diets. Animals were housed individually and fed *ad libitum* with the experimental diets during 10 days after weaning. During this period, average feed intake, weight gain and mortality were measured. Fecal digestibility was determined by total collection of hard feces from 31 to 34 d in 11 rabbits/diet. At 35 d, rabbits were slaughtered from 19:00 to 21:00 h and the weight of full organs of digestive tract, pH of stomach and cecum and ileal viscosity were recorded. AOAC (2000) procedures were used to determine the concentrations of DM, CP, and TDF (985.29). Dietary NDF, ADF, and ADL were determined sequentially (Mertens, 2002). The results were analyzed as a completely randomized block design, with the type of diet as the main source of variation and the litter as a block, using the GLM procedure of SAS. Weaning weight was included as covariate. Means were compared using a *t*-test.

Table 1 – Composition of the experimental diets.

	Control	Pectin	SBP	InsSBP
Ingredients				
Wheat straw	18.0	18.0	11.1	11.1
Sunflower hulls	18.0	18.0	11.1	11.1
Sugar beet pulp	—	—	26.0	—
Insoluble sugar beet pulp[1]	—	—	—	14.0
Pectin[2]	—	6.0	—	—
Wheat starch	36.0	30.0	26.7	36
Others [3]	28	28	26.1	26.8
Chemical composition, % DM				
CP	16.2	15.9	16.2	16.1
NDF	32.4	32.1	33.0	32.5
ADF	19.8	19.5	20.2	19.5
ADL	4.84	4.38	4.38	3.34
Soluble fibre (TDF-NDF)	3.7	8.4	9.7	3.0

[1]Residue after washing Sugar beet pulp (SBP) in hot NDF solution, filtration and dried. [2]Pectin extracted from SBP Betapec®. [3]Others in %: Casein 15.6–14.4, Arbocel 5.0-3.1, Saccharose 1.5 (InsSBP diet), Alfalfa hay-Yb 0.5, Soy bean oil 3.75, Sodium chloride 0.7, Calcium phosphate 0.9, Calcium carbonate 0.9, DL-methionine 0.1, Exal 0.25, Mineral-vitamin premix 0.5.

RESULTS AND CONCLUSIONS

The type of diet did not affect growth rate and stomach pH (Table 2). Nor mortality or health problems were detected. Control and InsSBP diets showed the lowest and highest (P<0.05) DM digestibility, respectively, showing Pectin and SBP diets intermediate values. DM digestibility of Pectin diet was not different from the Control diet. Since these diets only differed on the substitution of starch for pectins, this suggests a similar digestibility of these two chemical components. The NDF digestibility of these two diets was low, in agreement with previous results (García *et al*., 1999). The inclusion in the diet of SBP or their insoluble fibre fraction increased (P<0.05) NDF digestibility, in accordance with previous results (Gidenne, 1987).We found that the higher dietary DM digestibility, the lower feed intake and the higher gain:feed ratio. The rabbits fed with SBP and InsSBP diets showed higher (P<0.05) cecal (10%) and total digestive tract (7.2%) weight than those fed with control diet. Pectin diet also increased cecal weight compared to control diet, whereas reduced the weight of stomach. These results are in agreement with literature and explain carcass yield decrease in animals fed with diets high in SBP (García *et al*., 1993, Xiccato *et al*., 2011). When we compared SBP diet with their soluble or insoluble fractions (pectins and InsSBP diets), the insoluble fraction seems to be the main responsible of the high total digestive tract weight. The inclusion of SBP or their fractions increased the ileal viscosity (2.6 times on average, P<0.05) and decreased the cecal pH. Pectin diet showed higher viscosity than InsSBP diet; SBP diet resulted in intermediates figures. On the contrary, InsSBP diet lowered the cecal pH compared to Pectin diet. This effect is well correlated with NDF digestibility of diets. In conclusion, SBP and their soluble and insoluble fractions are well digested in young rabbits and permit to maintain comparable growth rates. However, the soluble and insoluble fractions of SBP produce different effects at the gastrointestinal tract.

Table 2 – Effect of type of diet on growth performance, some digestive traits and digestibility in rabbits fed experimental diets from weaning (25 d) to 35 days of age.

	Control	Pectin	SBP	InsSBP	rsd[1]	Diet
Growth performance (25-35 d)						
DM intake, g/d	64.8[a]	63.0[a]	59.0[ab]	56.7[b]	7.29	0.036
Daily weight gain, g/d	37.2	36.7	38.8	36.9	11.6	0.64
Gain: Feed, g/g	0.584[b]	0.595[b]	0.662[a]	0.665[a]	0.082	0.001
Weight of full organs, % BW						
Total digestive tract	21.5[b]	21.0[b]	23.4[a]	22.7[a]	1.97	0.001
Stomach	6.60[a]	4.79[b]	6.80[a]	6.74[a]	1.15	0.001
Caecum	6.13[b]	6.60[ab]	6.94[a]	6.73a	0.99	0.008
Ileal viscosity, mPa·s (log)	3.06[c]	9.77[a]	7.58[ab]	6.40[b]	0.434	0.001
pH of stomach	1.82	1.71	1.67	1.49	0.37	0.067
pH of cecum	6.23[a]	5.94[b]	5.67[bc]	5.63[c]	0.42	0.001
Fecal digestiblity, %						
DM	66.4[c]	67.8[cb]	69.0[b]	72.6[a]	2.46	0.001
NDF	14.3[c]	18.0[c]	26.2[b]	32.7[a]	4.77	0.001

[1]n=34 per group, except for ileal viscosity and digestibility where n=16 and 11, respectively. [a-c] Mean values in the same row with a different superscript differ, *P*<0.05.

REFERENCES

AOAC, 2000. Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.

Carabaño, R. Badiola, I., Chamorro, S., Garcia, J., Garcia-Ruiz, A.I., Garcia-Rebollar, P., Gomez-Conde, M.S., Gutierrez, I., Nicodemus, N., Villamide, M.J., de Blas, J.C., 2008. New trends in rabbit feeding: Influence of nutrition on intestinal health. Span. J. Agric. Res. 6:15-25.

García, G., Galvez, J.F., de Blas, J.C., 1993. Effect of substitution of sugar beet pulp for barley in diets for finishing rabbits on growth performance and on energy and nitrogen efficiency. J. Anim. Sci. 71:1823-1830.

García, J., Carabaño, R., de Blas, J.C., 1999. Effect of fiber source on cell wall digestibility and rate of passage in rabbits J. Anim. Sci. 77:898-905.

Gidenne, T., 1987. Addition of a fiber-rich concentrate to a hay-based diet offered at 2 levels of feeding to adults rabbits. 2. Digestibility measurements. Reprod. Nutr. Develop. 27:801-810.

Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. J. Assoc. Off. Assoc. Chem. Int. 85:1217-1240.

SAS, 1989. User's Guide: Statistics, Version 6. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Xiccato, G., Trocino, A., Majolini, D., Fragkiadakis, M., Tazzoli, M., 2011. Effect of decreasing dietary protein level and replacing starch with soluble fibre on digestive physiology and performance of growing rabbits. Animal (in press).

INFLUENZA DEL TENORE PROTEICO DELLA DIETA SUL LIVELLO EMATICO DI UREA, SUL PH UTERINO E SULL'EFFICIENZA RIPRODUTTIVA DI CONIGLIE IN LATTAZIONE

MARONGIU M.L.[1], GULINATI A.[2]

[1]*Dipartimento di Scienze Zootecniche, Università di Sassari, Italy*
[2]*Medico Chirurgo, Sassari, Italy*
Maria Laura Marongiu, Dipartimento di Scienze Zootecniche, Università di Sassari, Via De Nicola 9, 07100 Sassari (SS), Italy - Tel. +39 079 229304
*Corresponding author: marongiu@uniss.it

ABSTRACT

Influence of dietary protein on blood urea level, uterine pH and reproductive performance of lactating rabbit does

The effect of dietary protein level on uterine pH, plasma urea nitrogen concentrations (PUN) and reproduction efficiency was assessed through a trial involving 50 multiparous hybrid rabbit does. At day 27 of pregnancy, the animals were equally divided into 2 experimental groups fed on mixture at different protein levels: 18.5% (CP18.5=25) and 22% (CP22=25) on dry matter. Blood samples (=50) were taken at the same day of AI (12 days *post partum*) and plasma was assayed for PUN. Measurements of uterine pH (=50) were accomplished at day 12 *post partum* by inserting a microelectrode through the genital tract. Reproduction efficiency was evaluated by abdominal palpation 12 days after AI to determine the pregnancy rate (PR). CP22 rabbits exhibited significantly higher PUN levels and decreased uterine pH values compared to CP18.5 (35.1 *vs* 24.9 mg/dl, P<0.01; 7.3 *vs* 6.7 pH units, P<0.05), associated with reduced fertility: PR increased when does were fed a diet not exceeding in protein content (79.3 *vs* 69.8 % for CP18.5 *vs* CP22; P<0.01). The results indicate that high dietary CP may exert an adverse effect on reproduction efficiency by elevating PUN levels and altering the uterine environment in the lactating rabbit doe. Further research is needed to understand whether the reduction in uterine pH is mediated via ammonia, urea or some other factor. The benefits of feeding excess dietary protein to sustain optimum milk production and simultaneous pregnancy in female rabbits should be compared with potential negative effects on fertility before such a program is implemented.

Key words: Protein nutrition, Uterine pH, Conception rate, Lactating rabbit.

INTRODUZIONE

Le ricerche relative ai fabbisogni nutritivi ed energetici delle coniglie fattrici hanno avuto un forte impulso negli ultimi anni, in risposta all'affermarsi di piani riprodutti-

vi intensivi e all'utilizzazione di fattrici di elevata prolificità e capacità di allattamento. Dalla letteratura si evince, per contro, una limitata conoscenza delle conseguenze derivanti da diete con livelli proteici particolarmente elevati rispetto agli effettivi fabbisogni per la gravidanza e la lattazione, sulle prestazioni riproduttive delle fattrici. Scopo del presente lavoro è stato quindi quello di studiare l'influenza del tenore proteico della razione su possibili alterazioni dell'ambiente uterino, sul profilo ematico dell'urea e sull'efficienza riproduttiva nella coniglia in lattazione.

MATERIALI E METODI

La sperimentazione è stata condotta utilizzando 50 coniglie ibride (Martini) pluripare e al medesimo stadio di gravidanza. A partire dal 27° giorno di gestazione i soggetti sono stati suddivisi in 2 gruppi sperimentali omogenei che differivano per la razione costituita da mangimi a diverso livello proteico: 18,5% (gruppo PG18,5=25) e 22% (gruppo PG22=25) sulla sostanza secca. Le diete erano isoenergetiche e bilanciate per gli aminoacidi. I prelievi ematici (=50) per il dosaggio dell'urea plasmatica (PUN) sono stati effettuati il medesimo giorno dell'IA (12 giorni dopo il parto). Sul plasma è stata determinata la PUN tramite il metodo che combina ureasi, nitro prussiato, EDTA e salicilato con formazione di 2-2 dicarbossi-indofenolo. La misurazione del pH uterino è stata effettuata lo stesso giorno dei prelievi ematici per il dosaggio dell'urea, inserendo nel tratto genitale un microelettrodo flessibile fatto transitare all'interno di una pipetta sterile di plastica, lunga 30 cm. L'elettrodo veniva lasciato *in situ* sino ad ottenere una lettura del pH stabile (in genere da 0,5 a 1,5 minuti). Un elettrodo di riferimento, del tipo Ag-AgCl è stato inoltre posizionato sul fianco, preventivamente rasato, delle coniglie. La diagnosi di gravidanza veniva effettuata tramite palpazione addominale 12 giorni dopo ciascuna inseminazione al fine di definire il tasso di concepimento, rappresentato dalla percentuale di fattrici risultate positive alla palpazione sul totale delle fattrici inseminate. L'elaborazione statistica dei dati è stata eseguita mediante l'analisi della varianza con il metodo dei minimi quadrati LSM utilizzando il procedimento GLM del pacchetto statistico SAS (2000) e considerando come fattore principale l'effetto del livello proteico della razione.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Gli effetti dei due differenti livelli proteici della razione sul profilo ematico dell'urea, sul pH uterino e sul tasso di concepimento sono sintetizzati nella tabella 1. Le coniglie alimentate con la dieta caratterizzata da un più elevato tenore proteico (PG22) hanno evidenziato, il giorno dell'IA, una concentrazione ematica di urea significativamente più elevata rispetto alle coniglie del gruppo sperimentale PG18,5 (35,1 *vs* 24,9 mg/dl; P<0,01). La misurazione del pH ha rivelato una probabile alterazione del microambiente uterino associata all'integrazione proteica elevata. I valori del pH sono risultati significativamente più bassi nelle coniglie PG22 se confrontati con quelli relativi al gruppo PG18,5 (6,7 *vs* 7,3; P<0,05).

Tabella 1 – Effetto dei due differenti livelli proteici (18,5 e 22%) della razione sulle concentrazioni ematiche dell'urea, sul pH uterino e sul tasso di concepimento.

Parametri	PG18,5	PG22	Prob	RMSE
	(=25)	*(=25)*		
PUN (mg/dl)	24,9	35,1	<0,01	3,8
pH uterino (unità pH)	7,3	6,7	<0,05	1,1
Tasso di concepimento (%)	79,3	69,8	<0,01	4,3

Per quanto concerne il confronto tra i due gruppi sull'efficienza riproduttiva, i valori del tasso di concepimento sono apparsi inversamente proporzionali a quelli del parametro ematico-metabolico. Difatti, le coniglie PG18,5, caratterizzate da minori concentrazioni di PUN, hanno dimostrato una migliore efficienza riproduttiva con un tasso di concepimento significativamente più elevato rispetto alle coniglie PG22 (79,3 *vs* 69,8%; P<0,01).

Secondo Elrod *et al.* (1993), le alterazioni del pH uterino riscontrate in bovine alimentate con diete ad elevata densità proteica, potrebbero suggerire un effetto dei metaboliti della frazione proteica alimentare sui meccanismi deputati a regolare la composizione dei fluidi uterini. Il concepimento e lo stabilirsi della gravidanza rappresentano una progressione ordinata di eventi che agiscono in interrelazione coinvolgendo tutti i diversi tessuti del tratto riproduttivo: lo sviluppo follicolare esita nell'ovulazione, fertilizzazione dell'oocita, trasporto dell'embrione e suo sviluppo, riconoscimento materno ed impianto. L'ammoniaca, l'urea ed anche altri prodotti del metabolismo proteico potrebbero interferire in uno o più di questi passaggi, influenzando negativamente l'efficienza riproduttiva. L'ammoniaca difatti, in quanto sostanza tossica di scarto, viene elaborata a livello epatico e trasformata in urea per essere così eliminata con le urine. Questo processo fisiologico può venir inficiato da un eccesso proteico della dieta, in quanto il fegato rallenta il suo ciclo, con conseguenti problemi epatici temporanei, che vanno ad incidere su tutte le altre funzioni essenziali (a cominciare dall'attività renale), causando anche la messa in circolo di sostanza tossiche nel sangue (l'ammoniaca stessa) e proteine in eccesso che potrebbero danneggiare più o meno pesantemente l'embrione, il feto o anche solo la possibilità di concepimento. Il materiale seminale utilizzato per l'IA nella presente prova sperimentale aveva in media un pH pari a 7,2, quindi non dissimile a quello che viene considerato il valore di riferimento del seme fresco di coniglio (7,1) (Dal Bosco, 2008). Considerando quanto sia indispensabile ai fini del concepimento che il tratto genitale presenti determinate caratteristiche, si può ipotizzare che il pH uterino più basso delle coniglie alimentate con alti livelli proteici sia meno rispondente alle esigenze vitali dei nemaspermi. Ulteriori ricerche si rendono comunque necessarie ai fini di comprendere se la riduzione del pH uterino sia mediata via ammoniaca, urea o altri fattori. In una precedente pubblicazione (Marongiu e Gulinati, 2010), è stato dimostrato come un'eccessiva ingestione proteica interferisca significativamente sul numero dei follicoli ovarici di grandi dimensioni. Dal momento che tali strutture sono attive dal punto di vista della steroidogenesi e che il 17β-estradiolo rappresenta il principale fattore luteotropo nella coniglia, un tenore proteico della dieta troppo elevato potrebbe intervenire sull'efficienza riproduttiva anche tramite un impoverimento dell'attività

ovarica. Variazioni dell'ambiente intrauterino che sono associate a diete a forte densità proteica ed elevati livelli di urea ematica, possono risultare deleterie per gli embrioni. Cellule endometriali in coltura rispondono direttamente a concentrazioni crescenti di urea con alterazioni del pH ma soprattutto con un'aumentata secrezione di $PGF_{2\alpha}$ (Butler, 1998). Un eccesso di $PGF_{2\alpha}$ può interferire notevolmente sullo sviluppo e sulla sopravvivenza embrionale, fornendo quindi una correlazione plausibile tra gli alti livelli di urea plasmatica ed un peggioramento del tasso di concepimento riscontrato nella presente prova sperimentale. In conclusione, un'integrazione proteica della dieta particolarmente elevata rispetto agli effettivi fabbisogni derivanti dalla lattazione e dalla gravidanza, può determinare conseguenze negative sull'efficienza riproduttiva delle coniglie, aumentando le concentrazioni ematiche di urea ed alterando il microambiente uterino.

BIBLIOGRAFIA

Butler, W.R., 1998. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. J. Dairy Sci. 81:2533-2539.

Dal Bosco, A., 2008. Allevamento dei riproduttori. In: Avicoltura e Coniglicoltura, Le Point Vétérinaire, Milano, Italia, pp. 441-457.

Elrod, C.C., Van Amburgh, M., Butler, W.R., 1993. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. J. Anim. Sci. 71:702-706.

Marongiu, M.L., Gulinati, A., 2010. Ultrasound-assessed ovarian dynamics and pregnancy rates in lactating rabbit does with different protein supplementation. Reprod. Dom. Anim. 45(Suppl. S3):109.

SAS, 2000. *User's guide: Statistics, Version 6.03.* SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

PROVE DI INTEGRAZIONE CON ACQUA OZONIZZATA E CON ESTRATTI VEGETALI NEL CONIGLIO IN ACCRESCIMENTO

MASOERO G.[1], BARGE P.[1], CHICCO R.[1], SOLOMITA M.[1], ZOCCARATO I.[2]

[1]*CRA-PCM, Torino, Italy*
[2]*Dipartimento di Scienze Zootecniche, Università di Torino, Italy*
Giorgio Masoero, CRA-PCM, Via Pianezza 115, 10151 Torino, Italy - Tel. +39 347 5463061
*Corresponding author: giorgio_masoero@alice.it

ABSTRACT

Trials of integration by ozonized water and vegetal extracts in growing rabbits

In a first trial two groups of rabbits (n=182) were fed the same blank diet (CP 18.8%DM, CF 18.7, NDF 37.7) and Control group (C) had fresh water, while O group received ozonized drinking water (O_3 0.5-0.3 ppm) by 5h/week; a third group (M) received fresh water and a medicated diet. The mortality level was very high (43%) in the C and O groups, while M rabbits had a lower mortality rate (15%). In a second trial (n=140), the use of four vegetal products (Tannins, *Allium*, Humic acid, Probiotan) allowed to reduce mortality in rabbits fed C diet (5 *vs*. 11%). However, these products should be also tested in worse sanitary conditions.

Key Words: Rabbit, Ozonized water, Vegetal extracts, Mortality.

INTRODUZIONE

Il problema della mortalità nelle nidiate è uno dei punti critici del *management* cunicolo. Risposte nutrizionali sono state compiutamente studiate per definire un corretto equilibrio fra i livelli di fibra, di proteina e di energia digeribile, atto a ridurre al minimo le perdite di coniglietti nella fase pre-svezzamento e nella fase dell'ingrasso (Maertens, 2007). L'uso di estratti vegetali bio-attivi, di vario tipo, per la protezione dei conigli è assai controverso. Eiben *et al*. (2008) hanno provato su 510 conigli da 35 a 63 giorni quattro dispositivi preventivi, a base di Batteri Probiotici, Inulina, Acidi organici e Tannini, con risultati peggiorativi (in media 35,5%) rispetto al livello di mortalità del 25% nel Controllo Blank. Abu-Akkada *et al*. (2010) hanno individuato nell'aglio un rimedio preventivo contro la coccidiosi del coniglio. Zoccarato *et al*. (2008) hanno osservato riduzione della mortalità da 44% a 11% mediante uso di estratto di Tannini di castagno allo 0,45%. Nelle fattrici l'impiego di estratti vegetali stabilizzati Probiotan ha dimostrato di essere efficiente nel contenimento della mortalità dei coniglietti allattanti anche rispetto al controllo con mangime medicato (Meineri *et al*., 2011; Masoero *et al*., 2011). Il ricorso all'ozonizzazione dell'aria dimostrò di essere efficace in una stalla di alta montagna (Masoero *et al*., 2005). Nel

coniglio questa via (interessante forse per il contenimento delle micosi) è stata invece intrapresa nel presente lavoro per via alimentare applicando una leggera ozonizzazione dell'acqua di bevanda nel tentativo di controllare le infezioni enteriche. Nel lavoro è inserito anche un tentativo riguardante gli Acidi Umici, che hanno dimostrato attività benefiche per il rumine in bovine biologiche (Thomassen, 2000) effetto da noi non verificato alla Stazione Alpina.

MATERIALI E METODI

Una prima prova, realizzata nell'Azienda "Il Merlino" del CRA, con 182 conigli di razza Bianca Italiana e Macchiata Italiana, svezzati a 43d, posti fino a 83d in box di cemento (91×99 cm) provvisti di fondo rialzato in rete zincata Bekaert, alla densità di 8 capi/m^2, ha confrontato un gruppo ricevente una dieta Medicata (M) con due gruppi, riceventi rispettivamente una dieta bianca con acqua fresca *ad libitum* (C) ed un gruppo (O) ricevente mangime C (PG 18,8%SS; FG 18,7%; NDF 37,7%) ed acqua ozonizzata per 5 h alla settimana. L'acqua di bevanda ozonizzata è stata prodotta da un generatore elettrico di O_3 di media capacità (5 g/h; Barlesi I.N.C, Lesignano de' Bagni, PR) a partire da aria filtrata; il gas generato dall'effetto corona è stato aspirato dal tubo Venturi di una pompa di ricircolo quindi iniettato con un diffusore entro l'acqua contenuta in un recipiente inox, livellato a 40l mediante regolatore a galleggiante. L'apparecchio generatore è stato posto, in condizione di sicurezza, a funzionare in modo continuo ma limitato a 5 ore, una mattina per settimana. Il livello di O_3 non superava 0,5 ppm. La composizione della dieta-base (C) corrispondeva ai seguenti livelli sulla SS: PG 18,8%; FG 18,7%; NDF 37,7%. A questa dieta, nelle prima prova sono stati aggiunti gli antibiotici colistina (180 ppm), avilamycina (60 ppm) e tiamulina (40 ppm) per costituire la dieta medicata (M). Una seconda prova è stata realizzata presso il Centro Sperimentale del Dipartimento di Scienze Zootecnìche a Carmagnola, impiegando 140 conigli svezzati posti in gabbie singole a tre piani, allevati da 42 a 72d con la dieta di Controllo (C) dalla quale sono derivate le altre 4, integrate da estratti vegetali, nella fattispecie: Tannini (T) 0,7% (Silva Extracts S.r.l. Alba, CN); Allium (A) 0,7% (Biorama, Rogeno, LC); Acidi Umici (U) 0,5% (VALAGRO, Atessa, CH); Probiotan (P) 1% (Biorama, Rogeno, LC).

RISULTATI E CONCLUSIONI

Nella prima prova (Tabella 1) la mortalità nel gruppo C è stata molto elevata (43%), e tale è rimasta anche nel gruppo O, mentre è diminuita significativamente al 15% nel gruppo M; dunque il trattamento con acqua ozonizzata non ha avuto l'effetto protettivo sperato. Nella seconda prova (Tabella 2), a causa probabilmente del lungo vuoto sanitario, il gruppo di controllo (C) ha manifestato un livello di mortalità contenuto all'11%, mentre le quattro tesi sperimentali hanno fatto registrare un tasso di mortalità medio del 5%. La significatività statistica di questa tendenza favorevole, manifestata in condizioni di salute normali, sarebbe stata raggiunta disponendo del quadruplo

delle osservazioni. E' evidente, tuttavia, che la presente prova non consente nessuna inferenza circa la risposta a situazioni di salute anormali. Badagliacca *et al*. (2010) in condizioni commerciali consistenti (n=46,030) hanno riscontrato una mortalità media mensile di 14,4±11% con uso di antibiotici quando la morbidità senza prevenzione era 29,3±18%. I dati francesi di mortalità all'ingrasso desunti dal circuito della gestione tecnica (Lebas, 2011) sono stabilizzati dal 2006 intorno al 7,4-8,5%, grazie ad una sorveglianza protettiva. I dati ungheresi riportati da Eiben *et al*. (2008) ribadiscono il livello di base del 25% per la mortalità naturale, senza protezione, valori in aumento con interventi pseudo-attivi a base di Batteri Probiotici (Bioplus: 36%), Prebiotici (Inulina: 32,6%), Acidi Organici naturali (Formico, Acetico, Propionico e Butirrico: 37,6%), Estratti Vegetali (Tannini: 35,7%) segno inequivocabile della labilità dei mezzi di protezione naturali alternativi. In conclusione, le prove con acqua ozonizzata non hanno dimostrato un significativo ausilio per la sopravvivenza dei coniglietti nell'ingrasso, quando il livello di rischio sanitario era molto elevato. L'impiego di composti vegetali, testato con un disegno sperimentale di limitata potenza è risultato inespressivo anche a causa del basso livello di rischio riscontrato, tuttavia i risultati potrebbero suggerire di provare il Probiotan®, i tannini, l'estratto di aglio e gli acidi umici in condizioni di rischio sanitario superiore ed impiegando un più elevato numero di animali.

Tabella 1 – Prova di somministrazione di acqua ozonizzata ai conigli in accrescimento.

	Gruppi			*Probabilità (test di Fisher)*		
	O-Ozono	C-Blank	M-Medicato	O *vs.* C	O *vs.* M	C *vs.* M
n.	101	61	20			
Medie Mortalità (%)	42,6	42,6	15,0	*1*	*0,023*	*0,031*

Tabella 2 – Prova di somministrazione di estratti vegetali ai conigli in accrescimento.

	Gruppi						
	T-Tannini	A-Allium	U-Umici	P-Probiotan®	C-Control	TAUP	*Ipotesi*
n.	28	28	28	28	28	112	*N × 4*
Medie Mortalità (%)	7,1%	3,6%	7,1%	3,6%	10,7%	5,4%	
Prob. (T,A,U,P *vs.* C)	*1*	*0,611*	*1*	*0,611*		*0,383*	*0,051*

La ricerca è stata finanziata dal MiPAF (Roma) nell'ambito del Progetto "PROBENCO": Protezione, benessere e smaltimento nel coniglio da carne D.M. 486 del 7/12/2004.

BIBLIOGRAFIA

Abu-Akkada, S.S., Oda, S.S., Ashmawy, K.I., 2010. Garlic and hepatic coccidiosis: prophylaxis or treatment? Trop. Anim. Health Prod. 42:1337-1343.

Badagliacca, P., Letizia, A., Candeloro, L., Di Provvido, A., Di Gennaro, A., Scattolini, S., Pompei, G., Pedicone, R., Scacchia, M., 2010. Clinical, pathological and

microbiological profiles of spontaneous enteropathies in growing rabbits. World Rabbit Sci. 18:187-198.

Eiben, C, Gippert, T., Gódor-Surmann, K., Kustos, K., 2008. Feed additives as they affect the fattening performance of rabbits. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 625-630.

Lebas, F., 2011 Situation cunicole en France en 2009: Performances moyennes des élevages selon les résultats de RENACEB pour l'année 2009, situation du marché cunicole français. Cuniculture 37:74-82.

Maertens, L., 2007. Strategies for the reduction of antibiotic utilization during rearing. In: Atti Giornate di Coniglicoltura ASIC 2007, Forlì, pp. 1-11.

Masoero, G., Bergoglio, G., Terzano, G.M., Contestabile, G., 2005. Effect of air ozonization on physiological and production traits of Valdostana R.P. cows mountain stabled. Ital. J. Anim. Sci. 4(Suppl. 2):191-193.

Masoero, G., Meineri, G., Barge, P., Malavasi, C, Chicco, R., Solomita, M., 2011. Diete per fattrici acidificate o integrate con Probiotan®. In: Atti Giornate di Coniglicoltura 2011, Forlì, pp. 91-93.

Meineri, G., Masoero, G., Chicco, R., Solomita, M., 2011. Raising lactating rabbit does by PROBIOTAN at 1% integration or by medical prevention. In: Proc. XIX ASPA Congress, Cremona, submitted.

Thomassen, B.P.H., Faust, R. H., 2000. The use of a processed humic acid product as a feed supplement in dairy production in the Netherlands. In: Proc. IFOAM, Basle, p. 339.

Zoccarato, I., Gasco, L., Schiavone, A., Guo, K., Barge, P., Rotolo, L., Savarino, G., Masoero, G., 2008. Effect of extract of chestnut wood inclusion (enc®) in normal and low protein amminoacid supplemented diets on heavy broiler rabbits. Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 873-878.

INFLUENZA DELLA SOMMINISTRAZIONE DI DIETE IPOPROTEICHE IN CONIGLI IN ACCRESCIMENTO

MASOERO G., CHICCO R., SOLOMITA M.

CRA-PCM, Torino, Italy
Giorgio Masoero, CRA-PCM, Via Pianezza 115, 10151 Torino, Italy - Tel. +39 347 5463061
*Corresponding author: giorgio_masoero@alice.it

ABSTRACT

Effects of low protein diets fed to growing rabbits in varied housing and water conditions

A factorial 2×2×2 design was used to study the effects of nitrogen levels of the diets (P = normal protein level *vs.* L = Low-protein with 4 Amino-Acids integration), housing system (I = Individual cages *vs*. G = Group by 7 rabbits) and water regimens (L = *ad libitum* 24/24 *vs.* R = Restricted 20/24 h) on a total of 92 growing rabbits raised from 45 to 73 d. Twenty-four animals pre-selected by live NIR Spectroscopy were slaughtered and controlled in carcass by NIRS. Low protein diet did not improved protein utilisation with equality in all other traits. Group raising strongly reduced growth (-15%), feed intake (-6%), feed conversion efficiency (IC+15%), skin % (-7%), liver % (-18%) with greater incidence of slaughter (+14%) and chilling losses (+37%) and kidneys (+7%), and with strong differentiation of NIRS spectra in carcass (avg. R^2 0.54) but not in live. The water restriction reduced the intake of feed (-5%), increased the meat acidification (pH:-2%), strongly increased adiposity in renal (+110%) and scapular sites (+121%) with evident effects in live NIR scans of ear and loin (0.76) and average on the carcass (0.45).

Key Words: Aminoacids, Housing, Water restriction, Rabbit.

INTRODUZIONE

Il razionamento alimentare dei giovani è consigliato negli allevamenti come agente mitigatore di mortalità (Foubert *et al.*, 2008). Tuttavia il metodo è meno efficace, anzi controproducente secondo Bovera *et al*. (2008). Autori francesi (Verdelhan *et al*., 2004) hanno introdotto la restrizione idrica, anche severa (accesso 1,5; 3; 4h/24h) come agente indiretto di razionamento alimentare (consumi: -22; -17; -9%) evidenziando una sostanziale contrazione dell'abbeverata e quindi dei liquami (-38; -28; -13%). Una riduzione dell'acqua di bevanda, e del correlato consumo solido, può interferire con un soddisfacimento aminoacidico ottimale, per il quale si richiederebbe dunque una maggiore concentrazione. Obiettivo della presente prova

è lo studio di una moderata restrizione idrica, verificata in condizioni di gabbie singole e collettive e impiegando una dieta ipoproteica, integrata con 4 AA, oppure una dieta di livello proteico convenzionale.

MATERIALI E METODI

La prova è stata condotta su un totale 92 conigli all'ingrasso (45-73 d) impiegando un disegno sperimentale fattoriale 2×2×2: Dieta (P = Proteina normale pari a 18,8 PG %SS *vs.* M = Miniazotata (ipoproteica) pari a 16,7 PG% integrata con 4 AA) (Masoero *et al.*, 2011), Tipologia di gabbia a grigliato metallico (I=Individuale *vs.* C=Colonia con 7 capi alla densità di 8/m^2) e Regime idrico (L=24/24h *ad libitum vs.* R=20/24h Razionata tra le ore 8:00-12:00 del mattino). Il controllo NIR sul dorso e sulla pelle interna dell'orecchio effettuati al momento della pesata finale in ordine casuale rispetto ai gruppi (Masoero *et al.*, 2008) è servito a selezionare i 3 soggetti più centrali di ogni gruppo; in tal modo ogni livello dei tre fattori principali disponeva di 12 soggetti indipendenti utili per la valutazione statistica, effettuata con un modello lineare GLM del SAS, ad effetti fissi, schema incrociato, senza interazioni in quanto non risultate significative in base ad una analisi preliminare.

RISULTATI E CONCLUSIONI

La mortalità totale della prova è stata moderata (7,6%) e non è risultata influenzata da nessuno degli effetti studiati. Per quanto concerne l'effetto del tipo di dieta, non sono state osservate modificazioni significative nelle prestazioni produttive (Tabella 1) al contrario di quanto osservato in una precedente prova da Cherubini *et al.* (2008) che evidenziarono un miglioramento nell'efficienza azotata di crescita nel gruppo alimentato con dieta ipoproteica con piano alimentare bifasico. Anche le rese alla macellazione (Tabella 2) ed i rilievi NIRS *in vivo* e sulle carcasse (Tabella 3) non sono stati influenzati dal tenore proteico della dieta.

Tabella 1 – Prestazioni produttive (n=85) (a-b: P<0,05).

Variabili	R^2 mod	MSE	Dieta		Tipologia di gabbia		Razionamento idrico	
			P	M	I	C	24h	20h
Incremento medio giornaliero (IMG, g/d)	0,24	7,1	39,8	38,8	42,6a	35,9b	39,1	39,5
Consumo di alimento medio giornaliero (CMG, g/d)	0,21	12,4	155	157	160a	151b	160a	151b
Indice di conversione alimentare (ICA, g/g)	0,22	1,0	4,00	4,28	3,85b	4,43a	4,29	4,00
Efficienza Proteica (EP, Rapporto PG/IMG)	0,20	0,29	1,57	1,51	1,67a	1,41b	1,49	1,59

Tabella 2 – Parametri di macellazione (n=24) (a-b: P<0,05).

Variabili	R^2 mod	MSE	Dieta		Tipologia di gabbia		Razionamento idrico	
			P	M	I	C	24h	20h
Peso vivo (PV), g	0,41	137	2644	2610	2730a	2524b	2625	2629
Visceri, %PV	0,16	1,85	16,39	17,24	17,33	16,30	17,13	16,50
Pelle, %PV	0,46	0,71	16,59	16,80	17,28a	16,10b	16,68	16,71
Perdite, %PV	0,24	0,89	6,73	6,94	6,40b	7,28a	6,86	6,82
Carcassa calda (CC), g	0,33	83	1525	1473	1545a	1453b	1489	1510
Resa a caldo, %PV	0,18	0,020	0,58	0,56	0,57	0,58	0,57	0,57
Perdite refrig., %CC	0,25	0,67	2,19	2,03	1,78b	2,44a	2,19	2,03
pHu *L. dorsi*	0,24	0,11	5,82	5,79	5,79	5,82	5,86a	5,75b
Grasso Perirenale, %CC	0,50	0,49	1,26	1,17	1,33	1,11	0,79b	1,65a
Grasso Int.Scap., %CC	0,61	0,12	0,35	0,36	0,34	0,36	0,22b	0,48a
Reni, %CC	0,23	0,06	0,90	0,90	0,87b	0,93a	0,90	0,90
Fegato, %CC	0,39	0,60	4,23	4,00	4,54a	3,70b	4,10	4,14

Al contrario, la tipologia di allevamento in colonia (C) ha ridotto l'ingestione di alimento degli animali (CMG: -6%: P=0,004), un valore in linea con gli AA citati in bibliografia, ma ha limitato in maniera più che proporzionale la velocità di accrescimento corporeo (IMG: -15%: P=0,001), con peggioramento delle trasformazioni alimentari (ICA: +15%: P=0,03; EP: -16%: P<0,0001). Gli animali allevati in colonia hanno ovviamente mostrato pesi vivi alla macellazione e della carcassa inferiori, nonché una significativa riduzione dell'incidenza della pelle (-7%), con aumenti delle perdite alla macellazione (sangue, urine: +14%) e di refrigerazione (+37%); inoltre, sono risultate rispettivamente superiori e inferiori le incidenze di reni (+7%) e fegato (-18%). Infine i rilievi NIR effettuati *post mortem* sono stati fortemente influenzati dal tipo di gabbia (R^2 medio =0,54). I forti effetti possono essere ipoteticamente attribuiti alla eccessiva eccitabilità degli animali, non ibridi commerciali ma razze tradizionali. Il razionamento idrico ha indotto una significativa ma limitata riduzione dell'ingestione (-5%: P=0,002), senza incidere su accrescimento e trasformazione., in accordo con quanto osservato da Foubert *et al*. (2008). Affatto nuove sono apparse le differenziazioni pm negli animali con restrizione idrica di 4 h: pHu inferiori (-2%); maggiori depositi adiposi a livello perirenale (+110%) e interscapolare (+121%): rilievi NIRS *in vivo* di buona capacità discriminante.

In conclusione, la dieta ipoproteica ma integrata (miniazotata) ha mantenuto le caratteristiche produttive e fenotipiche del livello normale, le condizioni di allevamento in colonia hanno penalizzato i risultati e la restrizione idrica ha generato effetti limitati ma di rilevanza fenotipica singolare che potrebbero essere approfonditi ove il metodo trovi diffusione.

Tabella 3 – Rilievi NIR in vivo (n=85) e sulla carcassa (n=24); valori R2 di validazione incrociata.

Fattori	Carcassa							*In vivo*	
	Coscia	Dorso	Fegato	Grasso renale	Occhio	Obl. Abd	Grasso Int. Scap.	Orec-chio	Dorso
Dieta (P *vs.* M)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tipologia di gabbia (I *vs.* C)	0,71	0,56	0,55	0,48	0,45	0,46	0,56	0,01	0,01
Razionamento idrico (24 *vs.* 20h)	0,56	0,48	0,12	0,56	0,26	0,54	0,61	0,63	0,82

La ricerca è stata finanziata dal MiPAF (Roma) nell'ambito del Progetto "RENAI": Tecnologie alimentari per la riduzione dell'impatto ambientale da azoto negli allevamenti intensivi italiani

BIBLIOGRAFIA

Bovera, F., Di Meo, C., Marono, S., Vella, N., Nizza A., 2008. Feed restriction during summer: effect on rabbit growth performance, In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 567-572.

Cherubini, R., Barge. P., Baricco, G., De Poi, E., Masoero, G., 2008. Very low protein, aminoacid-supplied diet for heavy broiler rabbits: effects on growt. Feed efficiency, carcass and meat performances. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 595-599.

Foubert, C., Duperray. J., Boisot, P., Guyonvarch, A., 2008. Effect of feed restriction with or without free access to drinking water on performance of growing rabbits in healthy or epizootic rabbit enteropathy conditions. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 667-672.

Masoero, G., Sala, G., Meineri, G., Cornale, P., Tassone, S., Peiretti, P.G., 2008. NIR spectroscopy and electronic nose evaluation on live rabbits and on the meat of rabbits fed increasing levels of chia (*Salvia Hispanica L.*) seeds. J. Anim. Vet. Adv. 7:1394-1399.

Masoero, G., Miniscalco, B., Mattioda, R., Chicco, R., Solomita, M., 2011. Integrazione con aminoacidi di sintesi in diete ipoproteiche: prove di crescita e bilancio azotato. In: Atti Giornate di Coniglicoltura ASIC 2011, Forlì, Italia, pp. 99-101.

Verdelhan, S., Bourdillon, A., Morel-Saives, A., 2004. Effect of a limited access to water on water consumption, feed intake and growth of fattening rabbits. In: Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, pp. 1015-1021.

DIETE PER FATTRICI ACIDIFICATE O INTEGRATE CON PROBIOTAN®

MASOERO G.[1], MEINERI G.[2], BARGE P.[1], MALAVASI C.[3], CHICCO R.[1], SOLOMITA M.[1]

[1]*CRA-PCM, Torino, Italy*
[2]*Dip. Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università di Torino, Italy*
[3]*Biotrade s.n.c., Mirandola (MO), Italy*
Corresponding Author: Giorgio Masoero, CRA-PCM, Via Pianezza 115, 10151 Torino, Italy - Tel. +39 347 5463061
*Corresponding author: giorgio_masoero@alice.it

ABSTRACT

Acidified or integrated by Probiotan® diets for rabbit does

In the present work a "blend" of medium chain fatty acids (A: K20, 0.5% by Biotrade s.n.c. Mirandola MO) and an oil-extract vegetal integrator (P: Probiotan®, 1%, oil extracts of stabilised vegetables by *Glycine S., Menta P., Malus P., Centaurium U.,* by Biorama, Rogeno LC) were compared to a medicated (M, by three-antibiotic prevention active) and to a Control blank (C) diets (crude protein 16.5, crude fiber 18, NDF 37.5% DM). The M diet was fed to 63 multiparous Bianca Italiana and Macchiata Italiana does, involving 452 living pups, until the subgroups A, P and C were split and fed at -3d from kindling. A significant reduction of the 0-19d mortality was emerged for all the three treated groups (A: 16.3%; P: 17.2%; M: 14.8%) *vs*. the C group (35.6%). Elaboration of the four-mode mortality by PROC CATMOD of SAS, suited by Cluster Hierarchical Analysis of the probability matrix showed that A and P groups were closer than M group. Performances of the does, analysed by linear models, were unaffected by the integrate received regimens. It was concluded that a protection in the pups liveability was recovered, even at high mortality (35.6%), a second result for Probiotan®, and by first one, for the MCAFAs: some results which should be confirmed in longer trials.

Key Words: Rabbit does, Pre-weaning mortality, MCFA, Probiotan®.

INTRODUZIONE

Il problema della mortalità nelle nidiate è uno dei punti critici del management cunicolo. Risposte nutrizionali sono state compiutamente studiate per definire un corretto equilibrio fra i livelli di fibra, di proteina e di energia digeribile atto a ridurre al minimo le perdite di coniglietti nella fase pre-svezzamento e a massimizzare l'efficienza proteica del mangime. L'acidificazione delle diete è una pratica talora ritenuta efficace: secondo Cesari *et al*. (2008) l'impiego degli oli essenziali aumenta l'effetto protettivo degli acidi formico e lattico nella fase di accrescimento. Gli acidi grassi a

catena corta sono stati efficacemente impiegati nei suini in accrescimento da Baricco *et al*. (2008). Rari sono gli studi sulle fattrici allattanti: l'impiego del Probiotan® ha dimostrato in una prima prova (Meineri *et al*., 2011) di essere significativamente efficace nel contenimento della mortalità dei coniglietti allattanti, anche rispetto al controllo con mangime medicato.

MATERIALI E METODI

Un "blend" di acidi grassi a media catena (A: K20, Biotrade s.n.c. Mirandola MO), alla dose di 0,5%, in sostituzione di pari quantità di olio di soia) e un estratto oleoso di integratori vegetali stabilizzati di *Glycine S., Menta P., Malus P., Centaurium U.* (P: Probiotan®, Biorama, Rogeno LC) alla dose di 1% in sostituzione di pari quantità di olio di soia sono stati confrontati con due diete, di cui una medicata (M, con tre antibiotici: colistina 180 ppm, avilamycina 60 ppm e tiamulina 40 ppm) e una dieta di controllo priva di additivi (C: proteina grezza 16,5%; fibra grezza 18%; NDF 37,5%SS). La dieta M è stata somministrata a 63 fattrici di razza Bianca Italiana e Macchiata italiana fino a -3d dal parto, quando sono stati formati i tre sottogruppi A, P e C. Le fattrici pluripare sottoposte a ritmo riproduttivo semi-intensivo, inseminate artificialmente a 31d pp e svezzamento della nidiata a 40d sono state controllate per la produttività numerica, ponderale (a 3 e a 19d pp) e per il consumo volontario di mangime fra -3 e 19 d pp. Il tasso di mortalità dei coniglietti è stato elaborato con metodo Fisher esatto per i contrasti fra i gruppi, e con PROC CATMOD del SAS, con risposta bimodale (vivo/morto) e quadrimodale (vivi tutti, vivi in parte, morti in parte, morti tutti): la matrice delle probabilità delle differenze fra i gruppi è stata elaborata con Cluster Hierarchical Analysis (CHA, Statbox V6.5, Grimmer Logiciel, Paris). I rilievi effettuati sulle singole fattrici e sulle intere nidiate sono stati elaborati con la PROC GLM del SAS, come modello lineare bi-fattoriale ad effetti fissi, considerando il trattamento alimentare e la razza materna, covariati sul numero dei coniglietti presenti a 3d (N3).

RISULTATI E CONCLUSIONI

In totale sono stati controllati 63 parti, con 452 coniglietti vitali a 3d (Tabella 1). È stata riscontrata una significativa riduzione della mortalità 0-19d in tutti i tre gruppi trattati (A: 16,3%; P: 17,2%; M: 14,8%) *vs*. il gruppo di controllo C (35,6%). Quando il tasso di mortalità dei coniglietti è stato elaborato con risposta quadrimodale sono emersi andamenti differenziati all'interno dei quattro gruppi, causati dalla diversa distribuzione della mortalità entro le nidiate, totale e parziale: il calcolo del *cluster* medio fra i gruppi (Figura 1) pone in evidenza la scontata separazione del gruppo Controllo dagli altri, fra i quali tuttavia il gruppo Medicato appare a propria volta, in qualche misura, discosto dai gruppi integrati A e P.
Nessun effetto della dieta o della razza si è rivelato statisticamente significativo (Tabella 2). Un approfondimento sulla numerosità della nidiata a 19d non fa emergere

differenze statisticamente significative tra i quattro gruppi (P=0,43, Tabella 3) perché si riferisce alle 63 fattrici e non ai 452 coniglietti. In effetti, la differenza di mortalità fra C ed A è significativa a P=0,0025 (Tabella 1) perché riferita ai coniglietti. Infatti la differenza di numerosità di 1,74 coniglietti tra i gruppi C e A non significativa (P=0,107) per 63 parti sarebbe risultata significativa se si fosse controllato il doppio dei parti (P=0,0189).

Tabella 1 – Mortalità dei coniglietti osservata nei quattro gruppi e significatività delle differenze secondo il Chi quadro esatto di Fisher, e la PROC CATMOD del SAS con risposta bimodale (vivo/morto) e quadrimodale (vivi tutti; vivi in parte; morti in parte; morti tutti).

Gruppi					Probabilità dei contrasti						
C	A	P	M		CA	CP	CM	AP	AM	PM	Media
Medie Mortalità %				Fisher	*0,0025*	*0,002*	*0,0003*	*1*	*0,8539*	*0,727*	*0,431*
35,6	16,3	17,2	14,8	CAT-2	*0,0019*	*0,002*	*0,0004*	*0,8621*	*0,7417*	*0,6005*	*0,368*
				CAT-4	*0,0002*	*0,0008*	*<,0001*	*0,6505*	*<,0001*	*<,0001*	*0,217*
Numerosità della nidiata a 19 d a parità di coniglietti presenti a 3 d											
4,60	6,33	6,02	6,27		*0,107*	*0,165*	*0,105*	*0,764*	*0,947*	*0,806*	*0,482*

Tabella 2 – Matrice delle probabilità delle differenze fra i gruppi secondo CATMOD-4.

CAT-4	C	A	M	P
Control	1	0,0002	0,0001	0,0007
MCFAs	0,0002	1	0,2068	0,0967
Medicato	0,0001	0,2068	1	0,2726
Probiotan	0,0007	0,0967	0,2726	1

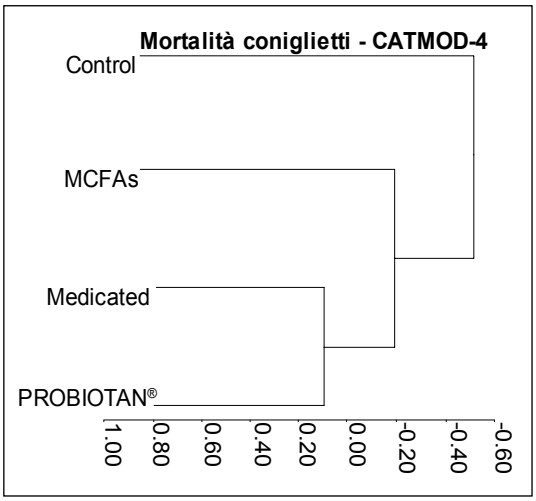

Figura 1 – Cluster CHA basato sulla matrice di probabilità delle differenze (Tabella 2).

Tabella 3 – Analisi statistica delle variabili numeriche e ponderali riferiti alle fattrici.

Variabili	Statistiche				*Probabilità*		*Covariata*
	R^2	CV	D.S.	Media	*Gruppo*	*Razza*	*N3*
Nati Vivi	0,32	33	2,2	6,75	*0,93*	*0,81*	*<,0001*
Morti 3-19d	0,14	154	2,3	1,48	*0,43*	*0,47*	*0,034*
N. coniglietti 19d	0,42	40	2,3	5,70	*0,43*	*0,47*	*<,0001*
Peso nidiata 3d, g	0,22	25	168	681	*0,91*	*0,11*	*0,001*
Peso nidiata 19d	0,35	24	528	2240	*0,88*	*0,40*	*<,0001*
Peso coniglietto 3d, g	0,05	25	24	95	*0,97*	*0,12*	*0,630*
Peso coniglietto 19d, g	0,08	20	69	342	*0,96*	*0,30*	*0,121*
Peso fattrice 3d, g	0,10	10	431	4349	*0,26*	*0,17*	*0,545*
Peso fattrice 19d, g	0,06	9	388	4479	*0,58*	*0,52*	*0,384*
Differenza peso fattrice, g	0,09	374	319	85	*0,38*	*0,62*	*0,229*
Mangime consumato, kg	0,04	16	1,1	7,14	*0,76*	*0,59*	*0,397*
Indice di Consumo kg/kg	0,20	40	1,4	3,51	*0,84*	*0,38*	*0,002*

In conclusione, è stato confermato un significativo effetto di protezione della vitalità dei coniglietti in seguito all'impiego di Probiotan® e tale effetto è stato attribuito per la prima volta all'acidificazione con acidi grassi a media catena. Si tratta di risultati preliminari, ottenuti peraltro in condizioni di elevata mortalità (35,6% da 3 a 19d), che richiederebbero conferma su esperienze prolungate.

BIBLIOGRAFIA

Baricco, G., Piovano, R., Malavasi, C., 2008. Manipolazione del grasso dietetico con acidi grassi a media catena: effetti sulle prestazioni dei suini in svezzamento. In: Atti SIPAS, pp. 153-156.

Cesari, V., Toschi, I., Pisoni, A.M., Grilli, G., Cesari, N., 2008. Effect of dietary acidification on growth performance and caecal characteristics in rabbits. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 583-588.

Meineri, G., Masoero, G., Chicco, R., Solomita, M., 2011. Raising lactating rabbit does by Probiotan® at 1% integration or by medical prevention. In: Proc. XIX ASPA Congress, Cremona, Italy, submitted.

DIETA IPOPROTEICA PER CONIGLIE ALLATTANTI E RELAZIONI FRA CREATININA E UREA NELLE URINE

MASOERO G.[1], MINISCALCO B.[2], MATTIODA R.[2], CHICCO R.[1], SOLOMITA M.[1]

[1]*CRA-PCM, Torino, Italy.*
[2]*Dipartimento di Patologia Animale, Università di Torino, Italy*
Giorgio Masoero, CRA-PCM, Via Pianezza 115, 10151 Torino, Italy - Tel. +39 347 5463061
*Corresponding author: giorgio_masoero@alice.it

ABSTRACT

Low protein diet for lactating does and relationships between creatinine and urea in urine

Decreasing protein level with AA integration (R: 16.94 *vs.* P: 18.69%DM) in the feed of milking does enhanced milk efficiency of nitrogen input by 17% with a 22% reduction in daily urea urine nitrogen (UUN), but the urine volume was unchanged. Creatinine (CREA) level in urine was negatively related to daily urine volume (-0,72) but positively related to Urea content (0.78). Favorable equation for predicting the daily UUN emission of lactating does was available: UUN g/d = 0.31 -0.00504 CREA (mg/dl) +0.00896 UREA (mg/dl); R^2 = 0.87. It would be beneficial to simplify the studies and eventually the field validations regarding nitrogen nutrition of the lactating does.

Key Words: Lactating rabbit does, Low protein, Urea urine nitrogen, Creatinine.

INTRODUZIONE

Le emissioni azotate nell'ambiente sono fonte di preoccupazione anche per la coniglicoltura (Xiccato *et al*., 2007). Nel bilancio dell'azoto totale ingerito con il mangime, le perdite fecali e urinarie rappresentano due quote rispettivamente pari al 25-27% e 17-25% (Calvet *et al*., 2008). Secondo Palomares *et al*. (2006) una riduzione da 18,4 a 16,1% di PG da 21 a 35 d non modifica le prestazioni delle fattrici allattanti; non risultano altri studi specifici sulla lattazione della coniglia. Nel suino la riduzione del livello proteico delle formule commerciali integrate con i quattro AA di sintesi, unita all'alimentazione per fasi ha aperto consistenti miglioramenti, con riduzione fino al 30% delle emissioni azotate, accompagnata da forti risparmi volumetrici per la minore sete degli animali (Rademacher, 2000). Obiettivi del presente lavoro sono le possibilità di una dieta ipoproteica integrata per le coniglie allattanti e di una stima oggettiva semplificata delle emissioni di azoto urinario ureico (NUU).

MATERIALI E METODI

La prova si è realizzata con 18 coniglie pluripare di razza Bianca Italiana e Macchiata Italiana, alimentate con due mangimi a differente livello proteico (P, R: Tabella 1), poste in gabbia metabolica, quindi trasferite al mattino nella prospiciente gabbia-fattrice per l'allattamento della nidiata. La doppia pesata della coniglia si è ripetuta 6 volte nell'arco da 2 a 18 d pp.; la raccolta totale delle urine delle 24h è stata ripetuta 4 volte con acidificazione, quindi mediata per ciascuna fattrice. Per il latte è stato considerato un contenuto proteico del 15,2% (Anderson, *et al.* 1975). Le analisi di Creatinina (Crea, diluizione 1/1) e Urea (diluizione 1/10) sono state realizzate con apparecchio automatico ILAB300 (Instrumentation Laboratory). Sono stati elaborati i dati medi per animale, ignorando le repliche, con la PROC GLM del SAS e con StatBox (Grimmer Logiciels, Paris) per le correlazioni e la regressione PLS.

Tabella 1 – Formulazione e composizione delle dieta Proteica (P) e Ridotta integrata con AA (R) per fattrici.

Formula	P	R	Composizione/SS		P	R
Cruschello di Frumento	26,55	29,94	PG	%	18,69	16,94
Medica disid., 17/27	18	18	EE	%	3,74	4,71
Polpe di bietole	13	13	FG	%	18,05	18,21
F.e. girasole	16	14	Ceneri	%	8,44	8,33
Mais ibrido	6	6	NDF	%	37,49	38,72
Orzo	10	10	ADF	%	20,11	20,31
Paglia	3	4,5	ADL	%	4,30	4,29
F.e. soia	4	0	Amido	%	15,34	15,64
Olio di soia	1	1,8	Amido & Zuccheri	%	19,22	19,18
Calcio Carbonato	1	1	ED	kcal	2837	2820
Integratore Vitaminico	0,5	0,5	ED	MJ	11,92	11,85
Fosfato Bicalcico	0,5	0,5	Metionina	g/kg	3,63	3,86
NaCl	0,4	0,4	Lisina	g/kg	7,46	7,56
Metionina	0,05	0,1	Treonona	g/kg	6,57	6,63
Lisina	0	0,15	Triptofano	g/kg	2,49	2,49
Treonina	0	0,08	Metionina e Cisteina	g/kg	6,56	6,51
Triptofano	0	0,025				

Tabella 2 – Risultati dei controlli sulle fattrici allattanti, da 2 a 18 giorni, con dieta Proteica (P) o Ridotta integrata con AA (R).

	R^2	CV	MSE	Media	Prob.	P	R	R / P
Ingestione, g/d	0,01	12	43	377	*0,68*	382	373	
Latte, g/d	0,01	20	40	198	*0,70*	194	202	
Urina, ml/d	0,00	20	40	196	*0,84*	194	198	
Urea, mg/dl	0,07	49	578	1192	*0,30*	1338	1047	
Creatinina, mg/dl	0,01	42	28,7	68,9	*0,64*	72,1	65,7	
N Ingerito, g/d	0,23	12	1,11	9,53	***0,04***	10,11	8,96	-11%

	R^2	CV	MSE	Media	Prob.	P	R	R / P
N Latte, g/d	0,01	20	0,98	4,82	*0,69*	4,73	4,91	
N Feci, g/d	0,23	30	0,99	3,25	***0,05***	3,76	2,75	-27%
N Urea Urine, g/d	0,08	43	0,45	1,03	*0,24*	1,15	0,90	-22%
Digeribilità App. Proteine	0,10	16	0,107	0,658	*0,21*	0,625	0,691	
Efficienza azotata Latte, g(latte) / g(N ingerito)	0,23	15	3,21	20,9	***0,05***	19,3	22,5	17%

RISULTATI E CONCLUSIONI

I risultati sulle fattrici riportati nella tabella 2 evidenziano che la dieta integrata a bassa proteina ha ridotto significativamente l'ingestione di N (-11%), ha incrementato del 17% l'efficienza della trasformazione della proteina alimentare in latte, ha ridotto del 22% l'Azoto Ureico (P=0,24), ma non ha ridotto il volume urinario. Si può osservare che curiosamente le quantità di urina e di latte emesse dalle coniglie tra 2 e 18d, si sono pareggiate sui 200 ml/d, peraltro esse sono risultate indipendenti tra di loro (r=0,26). L'urea è il principale catabolita azotato, che si forma nel fegato a seguito dei processi di deaminazione; esso rappresenta 0,8 su 0,9 g di N/l di urina nel coniglio, secondo Lebas (2002). Il coniglio ha limitate capacità di accumulo e incrementa l'urinazione per eliminarla; urea nel sangue e urea nelle urine sono apparse correlate positivamente nel giovane coniglio secondo Masoero *et al*. (2008): (r=0,35) quando una diminuzione del livello proteico ridusse entrambi i parametri del 32 e del 37% rispettivamente, con remissione conseguente del 27% nelle escrezioni azotate. La creatinina, catabolita della creatina, viene eliminata per via renale in quantità inversamente proporzionale al volume delle urine: la correlazione negativa -0,87 riscontrata precedentemente da Masoero *et al*. (2008) è stata confermata, meno forte, nel presente lavoro (-0,52 e -0,54; Tabella 3). Urea e Creatinina sono fortemente correlate (0,77 e 0,78; Tabella 3); dette interrelazioni hanno consentito di calcolare due equazioni PLS (Tabella 4) che utilizzano le analisi di creatinina e urea per stimare la quantità di urina e di azoto urinario da urea (NUU) prodotte giornalmente per capo con accuratezza maggiore per il secondo parametro (R^2=0,87) che per il primo (R^2=0,53). Detta equazione per la NUU potrebbe beneficiare lo studio e la eventuale verifica di campo della nutrizione azotata nelle fattrici allattanti.

Tabella 3 – Correlazioni semplici fra le variabili.

Variabili	Crea	Urea	Urina
Crea	1	0,78	-0,72
Urea	0,77	1	-0,52
Urina	-0,58	-0,54	1

Fattrici sopra la diagonale; giovani (da Masoero *et al*., 2008) sotto la diagonale.

Tabella 4 – Equazioni PLS per la stima delle emissioni urinarie per capo, giorno nei giovani e nelle fattrici allattanti.

	Urina (ml/d)	Azoto urinario ureico (NUU, g/d)
Costante	265	0,31
Creatinina (mg/dl)	-1,14248	-0,00504
Urea (mg/dl)	0,00839	0,00896
± se	27	0,16
R^2	0,53	0,87
Media ± dev.st	196 ± 39	1,03 ± 0,45

La ricerca è stata finanziata dal MiPAF (Roma) nell'ambito del Progetto "RENAI": Tecnologie alimentari per la riduzione dell'impatto ambientale da azoto negli allevamenti intensivi italiani.

BIBLIOGRAFIA

Anderson, R.R., Sadler, K.C., Knauer, M.W., Wippler, J.P., Marshall, R.T., 1975. Composition of cottontail rabbit milk from stomachs of young and directly from gland. J. Dairy Sci. 58:1449-1452.

Calvet, S., Estellés, F., Hermida, B., Blumetto, O., Torres, A.G., 2008. Experimental balance to estimate efficiency in the use of nitrogen in rabbit breeding. World Rabbit Sci. 16:205-211.

Lebas, F., 2002. Les reins et l'excrétion urinaire. In: La biologie du lapin. Website: http://www.cuniculture.info/Docs/indexbiol.htm (accessed 14/02/2011).

Masoero, G., Baricco, G., Cherubini, R., Barge, P., Sala, G., de Poi, E., 2008. Very low protein, aminoacid-supplied diet for heavy broiler rabbits: effects on nitrogen metabolism, and digital evaluation of excreta and products. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 729-734.

Palomares, J., Carabaño, R., García-Rebollar, P., De Blas, J.C., García-Ruíz, A.I., 2006. Effects of dietary protein reduction during weaning on the performance of does and suckling rabbits. World Rabbit Sci. 14:23-26.

Rademacher, M., 2000. How can diets be modified to minimize the impact of pig production on the environment?. Amino News Special Issue 1(1)3-10.

Xiccato, G., Trocino, A., Fragkiadakis, M., Majolini, D., 2007. Indagine sugli allevamenti di conigli in Veneto: risultati di gestione tecnica e stima dell'escrezione azotata. In: Atti Giornate di Coniglicoltura ASIC 2007, Forlì, pp. 115-117.

INTEGRAZIONE CON AMINOACIDI DI SINTESI IN DIETE IPOPROTEICHE: PROVE DI CRESCITA E BILANCIO AZOTATO

MASOERO G.[1], MINISCALCO B.[2], MATTIODA R.[2], CHICCO R.[1], SOLOMITA M.[1]

[1]*CRA-PCM, Torino, Italy.*
[2]*Dipartimento di Patologia Animale, Università di Torino, Italy*
Giorgio Masoero, CRA-PCM, Via Pianezza 115, 10151 Torino, Italy - Tel. +39 347 5463061
*Corresponding author: giorgio_masoero@alice.it

ABSTRACT

Low protein integrated by synthetic aminoacids diets for young rabbits: growth and nitrogen balance trials

A four-factorial Taguchi design was conceived to estimate effects of addition to zero-basal diet (#1, crude protein 16.7%DM) of 4 AA unilevel; in order the 4 factors were: A:Metionine, B:Lysine C = A*B (Threonine); D = Thryptophan. Nine diets (#1-9) were fed to 18 rabbits in metabolism cages from 40 to 68 d; each week the 9 diets were rotated by rabbits, so 8 records were available for each diet (n=72). Data from growth records enhanced significant positive effects on growth rate (+22%) accounted by Triptophane (added at 50g/t) also interacting with Metionine (50g/t). No effect was apparent in urine volume or in apparent digestibility. A second trial compared 9 rabbits fed diet #9 (M) (Mini-nitrogen with added 4 AA) *vs.* 9 rabbits fed by a normal protein diet (C, Control: crude protein 18.8%). The limited protein level (M *vs.* C) did not reduce urine volume and depressed the digestive and metabolic utilisation of the protein, a result which need further investigation.

Key Words: Rabbit, Taguchi design, Aminoacids, Growth, Nitrogen balance.

INTRODUZIONE

Nonostante l'intensa attività microbica intestinale, il coniglio necessita di 10 aminoacidi (AA) essenziali (Adamson e Fisher, 1973) tra cui 4 sintetici sono ora disponibili per l'industria mangimistica. Numerose prove alimentari hanno determinato il livello critico per la funzionalità intestinale, in rapporto all'energia del mangime (Trocino *et al*., 2000; Cherubini *et al*., 2008); oltre il limite di 12 (g/MJ) proteina/energia digeribile il rischio di mortalità si può innalzare ben oltre il valore medio, che si aggira in Francia sul 7-9% (Lebas, 2010).

MATERIALI E METODI

Un disegno sperimentale quadrifattoriale secondo Taguchi (1991) è stato impiegato per valutare l'effetto dell'addizione dei 4 AA sintetici con unico livello ad una dieta-base (#1, proteina grezza 16,7%SS); nell'ordine i 4 fattori (Tabella 1) erano: A: Metionina, B: Lisina, C = A*B (Treonine); D = Triptofano. Nove diete (#1-9, Tabella 2) sono state somministrate a 18 conigli posti in gabbie metaboliche, da 40 a 68 d; le 9 diete sperimentali sono state permutate settimanalmente e ciò ha permesso di ottenere 8 dati/settimana per ciascuna dieta (n=72). Il volume urinario delle 24h si è determinato il venerdì, mentre le feci sono state raccolte e trattate secondo la metodica armonizzata europea citata in Masoero et al (2008). In una prova successiva (n=18) della durata di una settimana sono state poste a confronto la dieta #9 (M: Ipoproteica formulata con tutti i suddetti AA di sintesi) e una dieta contenente standard (C, proteina grezza 18,8%). I dati sono stati elaborati con il SAS.

Tabella 1 – Disegno sperimentale, quadri-fattoriale secondo Taguchi (1991).

	DL-Met Metionina	L-Lys -Lisina	L-Tre Treonina	L-Try Triptofano	Interazioni		
Dieta	A	B	C(AB)	D	AD	BD	ABD
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	1	1	1	1
3	0	1	1	0	0	1	1
4	0	1	1	1	1	0	0
5	1	0	1	0	1	0	1
6	1	0	1	1	0	1	0
7	1	1	0	0	1	1	0
8	1	1	0	1	0	0	1
9-M	1	1	1	1	0	0	1

Tabella 2 – Composizione della diete, integrazione con AA e composizione chimica.

Ingredienti (%)	**C**	**9M**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
Cruschello di grano	20,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0	23,0
Medica dis, 17/27	12,0	22,2	22,20	22,2	22,2	22,2	22,2	22,2	22,2	22,2
Polpe di bietole	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0	17,0
Girasole f.e.	22,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Mais ibrido	10,0	9,70	9,70	9,70	9,70	9,70	9,70	9,70	9,70	9,70
Orzo	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Paglia	5,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Soia f.e.	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Melasso	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Calcio carbonato	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Integrat. vitaminico	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Fosfato bicalcico	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Ingredienti (%)	**C**	**9M**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
NaCl	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Metionina	0,05	0,05	-	-	-	-	0,05	0,05	0,05	0,05
Lisina	0,15	0,15	-	-	0,15	0,15	-	-	0,15	0,15
Treonina	-	0,05	-	-	0,05	0,05	0,05	0,05	-	-
Triptofano	-	0,05	-	0,05	-	0,05	-	0,05	-	0,05
Composizione chimica calcolata										
Proteina grezza (%)	18,79	16,72	16,72	16,72	16,72	16,72	16,72	16,72	16,72	16,72
Estratto etereo (%)	2,73	2,98	2,98	2,98	2,98	2,98	2,98	2,98	2,98	2,98
Fibra grezza (%)	18,70	18,84	18,84	18,84	18,84	18,84	18,84	18,84	18,84	18,84
Ceneri %	8,34	8,72	8,72	8,72	8,72	8,72	8,72	8,72	8,72	8,72
NDF %	37,69	38,72	38,72	38,72	38,72	38,72	38,72	38,72	38,72	38,72
ADF %	21,23	21,64	21,64	21,64	21,64	21,64	21,64	21,64	21,64	21,64
ADL %	4,66	4,67	4,67	4,67	4,67	4,67	4,67	4,67	4,67	4,67
Amido (%)	14,93	14,94	14,94	14,94	14,94	14,94	14,94	14,94	14,94	14,94
Energia dig. (MJ/kg)	11,49	11,51	11,51	11,51	11,51	11,51	11,51	11,51	11,51	11,51
Metionina (g/kg)	3,788	3,33	2,83	2,8	2,8	2,8	3,3	3,3	3,3	3,3
Lisina (g/kg)	8,676	7,84	6,34	6,3	7,8	7,8	6,3	6,3	7,8	7,8
Treonina (g/kg)	6,546	6,41	5,91	5,9	6,4	6,4	6,4	6,4	5,9	5,9
Triptofano (g/kg)	2,338	2,65	2,15	2,6	2,1	2,6	2,1	2,6	2,1	2,6
AA solforati (g/kg)	6,663	6,35	5,35	5,3	5,3	5,3	5,8	5,8	5,8	5,8

RISULTATI E CONCLUSIONI

I dati di crescita hanno evidenziato un significativo effetto da parte del Triptofano (+50g/t; 2,6% *vs* 2,1%) che ha determinato un incremento medio giornaliero di 39,1 *vs.* 32,7 g/d (+22%, P=0,025, Tabella 3) evidenziando nel contempo un effetto sinergico (P=0,011) con la Metionina (+50g/t). Adamson e Fisher già nel 1973 dimostrarono che Triptofano riveste un ruolo preminente, con effetti da carenza ma senza difetti da eccessi. Al contrario emissione urinaria e utilizzazione digestiva e metabolica non sono state modificate. Nella seconda prova, la dieta a ridotto livello proteico ridotto (M) non ha consentito di limitare la produzione di urine e ha peggiorato fortemente l'utilizzazione digestiva e metabolica dell'azoto (Tabella 4) in accordo con quanto osservato in precedenza (Masoero *et al.*, 2008). In sostanza la prova metabolica non pare corroborare le favorevoli acquisizioni di allevamento, realizzate in condizioni di maggiore rischio ambientale e meriterebbe approfondimenti ulteriori.

Tabella 3 – Prima prova: performances, digeribilità, urina: effetti e significatività.

Fattori	A.A.	Peso vivo	IMG[1]	CMG[2]	Peso feci	CUDa SS	CUDa PG	Urina
(n=52)	R^2 --->>>	*0,03*	*0,20*	*0,03*	*0,11*	*0,07*	*0,04*	*0,02*
A	Met	*0,880*	*0,32*	*0,87*	*0,36*	*0,29*	*0,74*	*0,88*
B	Lys	*0,814*	*0,64*	*0,91*	*0,54*	*0,74*	*0,25*	*0,86*
(C)AB	(Tre) (Met*Lys)	*0,205*	*0,78*	*0,46*	*0,51*	*0,62*	*0,86*	*0,88*
D	Tri	*0,938*	***0,02***	*0,81*	*0,97*	*0,57*	*0,64*	*0,74*
AD	Met-Tri	*0,623*	***0,01***	*0,76*	*0,07*	*0,15*	*0,85*	*0,71*
BD	Lys-Tri	*0,925*	*0,29*	*0,54*	*0,68*	*0,54*	*0,79*	*0,26*
ABD	Met-Lys-Tri	*0,730*	*0,63*	*0,34*	*0,26*	*0,81*	*0,33*	*0,75*

[1]IMG: Incremento Medio Giornaliero; [2]CMG: Consumo Medio Giornaliero.

Tabella 4 – Seconda prova in gabbia metabolica (n=18) (a,b=P<0,05).

Variabili	R^2	MSE	Prob	Dieta-C	Dieta-M
Accrescimento Medio Giornaliero, g/d	0,01	18,8	*0,67*	47,92	51,67
Consumo Medio Giornaliero, g/d	0,01	35,6	*0,62*	185,4	193,7
Indice di Consumo, g/g	0,00	1,45	*0,96*	4,22	4,25
Urina, g/d	0,09	134,8	*0,24*	273	350
Creatinina, mg/dl	0,01	6,83	*0,68*	24,07	22,72
CUD_ PG	0,31	0,069	*0,01*	0,72a	0,63b
Azoto ingerito, g/d	0,04	0,897	*0,42*	4,91	4,56
Azoto fecale, g/d	0,09	0,48	*0,21*	1,40	1,69
Azoto Ureico Urinario, g/d	0,00	0,346	*0,98*	0,97	0,98
Azoto Ritenuto, g/d	0,24	0,606	*0,04*	2,53a	1,89
Quota Azoto Fecale	0,31	0,069	*0,01*	0,28b	0,37a
Quota Azoto Ureico Urinario	0,02	0,058	*0,54*	0,20	0,21
Quota Ritenzione Azotata	0,25	0,095	*0,03*	0,52a	0,41b

La ricerca è stata finanziata dal MiPAF (Roma) nell'ambito del Progetto "RENAI": Tecnologie alimentari per la riduzione dell'impatto ambientale da azoto negli allevamenti intensivi italiani".

BIBLIOGRAFIA

Adamson, I, Fisher, H., 1973. Amino acid requirement of the growing rabbit: an estimate of quantitative needs. J. Nutr. 103:1306-1310.

Cherubini, R., Barge, P., Baricco, G., de Poi, E., Masoero, G., 2008. Very low protein, aminoacid-supplied diet for heavy broiler rabbits: effects on growth, feed efficiency, carcass and meat performances. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 596-600.

Masoero, G., Baricco, G., Cherubini, R., Barge, P., Sala, G., de Poi, E., 2008. Very low protein, aminoacid-supplied diet for heavy broiler rabbits: effects on nitrogen

metabolism, and digital evaluation of excreta and products. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 729-734.

Taguchi, G., 1991. Introduzione alle tecniche per la qualità; progettare qualità nei prodotti e nei processi, Franco Angeli/Azienda Moderna.

Trocino, A., Xiccato, G., Sartori, A., Queaque, P.I., 2000. Feeding plans at different protein levels: effects on growth performance, meat quality and nitrogen excretion in rabbits. In: Proc. 7th World Rabbit Congress, Valencia, Spain, C:467-47.

RIDUZIONE DEL LIVELLO PROTEICO E AUMENTO DEL RAPPORTO FIBRA SOLUBILE/AMIDO IN DIETE PER CONIGLI IN ACCRESCIMENTO

TAZZOLI M.[1], MAJOLINI D.[1], TROCINO A.[2], XICCATO G.[1]

[1]*Dipartimento di Scienze Animali, Università di Padova, Italy*
[2]*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria.*
Angela Trocino, Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy
Tel. +39 049 8272639 - Fax: +39 049 8272669
*Corresponding author: angela.trocino@unipd.it

ABSTRACT

Reducing crude protein and increasing soluble fibre to starch ratio in diets for growing rabbits

From 29 d of age until slaughter (78 d), 282 rabbits were fed six diets formulated in order to evaluate the combined effect of dietary protein level (CP: 13.9 *vs*. 15.4 *vs*. 17.5%) and soluble fibre to starch ratio (0.5 *vs*. 1.1). Health status was good in all groups. When dietary CP decreased, diet DM digestibility, daily growth rate and caecal volatile fatty acid (VFA) concentration significantly decreased. When soluble fibre to starch ratio increased, diet DM and fibre fractions digestibility significantly raised, feed intake decreased and feed conversion improved; at caecum, VFA concentration increased and N-ammonia level diminished. In conclusions, decreasing dietary CP until 13.9% impaired rabbit growth, while replacing starch with soluble fibre had advantages on both performance and caecal fermentations.

Key words: Soluble fibre, Crude protein, Growth performance, Digestibility.

INTRODUZIONE

La somministrazione di diete con alto amido e bassa fibra insolubile (NDF o ADF) è considerata causa di disturbi digestivi nei giovani conigli (Blas e Gidenne, 2010). La parziale sostituzione dell'amido con fibra solubile (principalmente pectine), a parità di fibra insolubile, consentirebbe di mantenere un elevato valore energetico delle diete, con effetti positivi su conversione alimentare, attività fermentativa ciecale e stato di salute degli animali (Perez *et al*., 2000; Trocino *et al*., 2011). I livelli di fibra solubile e amido della dieta possono tuttavia interagire con la proteina che, a sua volta, condiziona le fermentazioni e la composizione microbica ciecale oltre che le prestazioni produttive (Carabaño *et al*., 2009; Xiccato *et al*., 2011). Il presente studio ha inteso verificare l'effetto della riduzione del livello proteico e dell'aumento

del rapporto fibra solubile/amido su efficienza alimentare, attività fermentativa ciecale, e prestazioni produttive in conigli in accrescimento.

MATERIALI E METODI

Dallo svezzamento (età 29 d) alla macellazione (78 d), 282 conigli ibridi Hyla sono stati allevati in gabbia individuale e alimentati con sei diete sperimentali non medicate, formulate secondo un disegno bifattoriale con tre livelli di proteina (LP: 13,9%; MP: 15,4%; HP: 17,5%) e due rapporti fibra solubile/amido (R1: 0,5; R2: 1,1) (Tabella 1). Pesi e consumi alimentari sono stati rilevati individualmente tre volte la settimana; lo stato di salute è stato controllato quotidianamente. A 38 d, 36 conigli (6 per dieta) sono stati sacrificati per i prelievi ciecali. Dai 56 ai 60 d di età, è stata realizzata una prova di digeribilità *in vivo* su 72 conigli. La digeribilità e la composizione chimica di diete, contenuti ciecali e feci sono state determinate con i metodi descritti da Xiccato *et al*. (2011). I risultati sono stati sottoposti ad analisi della varianza in funzione di livello di proteina, rapporto fibra solubile/amido e loro interazione, utilizzando la procedura GLM del SAS. L'interazione non è risultata significativa e i risultati sono di seguito presentati in funzione dei fattori principali.

Tabella 1 – Formulazione, composizione chimica e valore nutritivo delle diete.

	Dieta					
	LP-R1	MP-R1	HP-R1	LP-R2	MP-R2	HP-R2
Ingredienti (%):						
Erba medica disidratata 17% PG	44,0	37,5	31,0	22,0	18,7	15,4
Crusca di frumento	35,2	23,6	12,0	18,3	11,9	5,5
Orzo	16,0	21,5	27,0	16,0	18,1	20,2
Polpe secche di bietola	0	4,0	8,0	30,0	31,5	33,0
F.e. di soia 48% PG	0	2,0	4,0	4,0	6,5	9,0
F.e. di girasole 35% PG	0	7,1	14,2	5,0	9,3	13,6
Altro e integrazioni	4,8	4,3	3,8	4,7	4,0	3,3
Composizione chimica (sul t.q.):						
Sostanza secca, %	89,0	89,1	89,2	88,9	88,6	89,0
Proteina grezza, %	13,7	15,1	16,9	14,1	15,7	18,0
NDF, %	34,7	33,3	31,7	32,3	31,0	29,3
ADF, %	17,5	17,3	16,8	16,8	16,6	16,0
ADL, %	3,3	3,2	3,1	2,5	2,5	2,5
Fibra solubile, %	7,5	8,0	9,8	14,3	14,5	13,5
Amido, %	18,0	17,7	17,6	14,0	12,7	12,3
Rapporto fibra solubile/amido	0,41	0,45	0,56	1,02	1,14	1,09
Energia digeribile (ED), MJ/kg	9,5	9,8	10,3	10,5	10,6	10,8

RISULTATI E CONCLUSIONI

Durante la prova, lo stato sanitario è stato buono e non influenzato dai trattamenti alimentari. La riduzione del livello proteico della dieta ha penalizzato la digeribilità della sostanza secca, della proteina (per la maggiore presenza di erba medica piuttosto che di f.e. di soia e girasole) e delle frazioni fibrose (per la diversa origine e struttura della fibra insolubile nelle diete) (Tabella 2). La riduzione del livello proteico al 13,9% ha penalizzato l'accrescimento e la conversione alimentare nell'intera prova (Tabella 3), ma soprattutto nel primo periodo (accrescimento tra 29 e 50 d di età: 49,3 *vs.* 53,1 e 55,1 g/d con le diete LP, MP e HP; P<0,001; dati non riportati in tabella). A livello ciecale, le diete LP hanno determinato una concentrazione di acidi grassi volatili (AGV) minore (61,9 *vs.* 73,7 e 78,0 mmol/L; P<0,01) e un pH maggiore (5,92 *vs.* 5,71 e 5,75; P=0,05), confermando precedenti osservazioni (Xiccato *et al*., 2011). L'aumento del rapporto fibra solubile/amido, ottenuto principalmente mediante la sostituzione dell'erba medica e della crusca con polpe di bietola, ha significativamente migliorato la digeribilità della sostanza secca, come conseguenza dell'aumento della digeribilità delle frazioni fibrose insolubili (circa +15 punti percentuali per NDF e ADF) (Tabella 2). Nonostante la riduzione del contenuto di amido, il valore energetico delle diete è pertanto aumentato (da 9,9 a 10,6 MJ ED/kg per le diete R1 e R2) determinando una minore ingestione e una migliore conversione alimentare, a parità di accrescimento giornaliero e peso vivo finale (Tabella 3). Simili risultati erano stati ottenuti da Perez *et al*. (2000), mentre Xiccato *et al*. (2011) non avevano osservato variazioni del valore nutritivo delle diete e delle prestazioni dei conigli pur riportando un aumento della digeribilità delle frazioni fibrose. Nel presente studio, la sostituzione di amido con fibra solubile ha inoltre aumentato la concentrazione di AGV (da 64,0 a 78,4 mmol/L; P<0,001), e ridotto il pH (da 5,87 a 5,71; P=0,03) e il livello di azoto ammoniacale nel cieco (da 4,7 a 2,3 mmol/L; P<0,001) (dati non riportati in tabella), confermando nostri precedenti risultati (Trocino *et al*., 2011; Xiccato *et al*., 2011). Come visto per la proteina, tali risultati sono in parte ascrivibili anche alla diversa struttura e al diverso grado di lignificazione della fibra insolubile.

In conclusione, la somministrazione di diete con un contenuto proteico pari al 13,9% ha peggiorato le prestazioni produttive nel primo periodo di accrescimento e condizionato i risultati dell'intero periodo di prova. La sostituzione di amido con fibra solubile e i conseguenti cambiamenti nella struttura della fibra insolubile, sono risultati vantaggiosi, sia in termini di prestazioni produttive che di fermentazioni ciecali.

Tabella 2 – Coefficienti di digeribilità (a-c =P<0,05).

	Livello proteico				Fibra solubile/amido			DSR
	13,9%	15,4%	17,4%	Prob.	0,5	1,1	Prob.	
Sostanza secca	61,6[a]	63,6[b]	66,1[c]	<0,001	60,5	67,0	<0,001	1,7
Proteina grezza	74,7[a]	75,2[a]	77,2[b]	<0,001	75,8	75,6	0,55	1,5
NDF	26,9[a]	29,1[b]	30,9[b]	<0,001	21,6	36,3	<0,001	3,4
ADF	14,4[a]	18,3[ab]	19,4[b]	<0,001	9,6	25,2	<0,001	3,7
Energia lorda	61,6[a]	63,3[b]	65,7[c]	<0,001	60,4	66,7	<0,001	1,8

Tabella 3 – Prestazioni produttive (a,b = P<0,05).

	Livello proteico				Fibra solubile/amido			DSR
	13,9%	15,4%	17,4%	Prob.	0,5	1,1	Prob.	
Peso vivo a 29 d, g	597	596	598	0,99	596	597	0,86	60
Peso vivo a 76 d, g	2790[a]	2840[ab]	2908[b]	<0,01	2826	2867	0,14	207
Accrescimento, g/d	44,8[a]	45,8[ab]	47,1[b]	<0,001	45,5	46,3	0,12	3,9
Consumo, g/d	137	137	138	0,99	142	133	<0,001	13
Indice di conversione	3,07[b]	3,01[b]	2,92[a]	<0,001	3,13	2,87	<0,001	0,21

Lo studio è stato finanziato dal MIUR (PRIN2005 - Prot. 2005070702). Gli autori ringraziano il Dott. Andrea Zuffellato, Veronesi Verona S.p.A., per il supporto tecnico.

BIBLIOGRAFIA

Blas, E., Gidenne, T., 2010. Digestion of starch and sugars. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) The nutrition of the rabbit, 2nd edition. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 19-38.

Carabaño, R., Villamide, M.J., García, J., Nicodemus, N., Llorente, A., Chamorro, S., Menoyo, D., García-Rebollar, P., García-Ruiz, A.I., De Blas, J.C., 2009. New concepts and objectives for protein-amino acid nutrition in rabbits. A review. World Rabbit Sci. 17:1-14.

Perez, J.M., Gidenne, T., Bouvarel, I., Arveaux, P., Bourdillon, A., Briens, C., La Naour, J., Messager, B., Mirabito, L., 2000. Replacement of digestible fibre by starch in the diet of growing rabbits. II. Effects on performances and mortality by diarrhoea. Ann. Zootech. 49:369-377.

Trocino, A., Fragkiadakis, M., Majolini, D., Carabaño, R., Xiccato, G., 2011. Effect of the increase of dietary starch and soluble fibre on the digestive efficiency and growth performance of meat rabbits. Anim. Feed Sci. Technol. (under evaluation).

Xiccato, G., Trocino, A., Majolini, D., Fragkiadakis, M., Tazzoli, M., 2011. Effect of decreasing dietary protein level and replacing starch with soluble fibre on digestive physiology and performance of growing rabbits. Animal (in press).

Sessione Benessere e Management

MONITORAGGIO DEI PARAMETRI AMBIENTALI IN ALLEVAMENTI DI CONIGLI DA CARNE ED ANALISI DELL'INFLUENZA STAGIONALE

BONCI M.[1], DA BORSO F.[2], MEZZADRI M.[2], TERI F.[2], BANO L.[1], DRIGO I.[1], MAZZOLINI E.[1], AGNOLETTI F.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Treviso, Italy*
[2]*Dipartimento di Scienze agrarie e ambientali, Università di Udine, Italy*
Michela Bonci, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Treviso, Viale Brigata Treviso 13/a, 31100 Treviso (TV) Italy - Tel. +39 0422 302302 - Fax: +39 0422 421154
*Corresponding author: mbonci@izsvenezie.it

ABSTRACT

Monitoring of environmental parameters in fattening rabbit farms and seasonal trend analysis

In order to objectively and exhaustively evaluate the influence of different atmospheric conditions on the microclimate and air quality inside rabbit farms, parameters such as temperature, relative humidity, air speed, air flow, total air exchange, noxious gases concentrations, environmental and pathogenic bacteria and fungi counts were monitored during the post-weaning and pre-slaughter phases of four fattening cycles that took place in an intensive rabbit farm, over a 12-month period. The data collected in this study highlight that, as for noxious gases concentrations, winter is the most critical season, as for total dust and total bacterial and fungi counts, autumn together with winter is the most critical season, whereas high counts of pathogenic bacteria, in this case *P. multocida*, were recorded in the pre-slaughter phase in autumn, followed by summer.

Key words: Rabbit farms, Environmental parameters, Welfare.

INTRODUZIONE

La qualità di vita degli animali allevati intensivamente dipende, in parte, da fattori che caratterizzano l'ambiente d'allevamento, quali il microclima e la qualità dell'aria (Hartung e Philips, 1994; Seedorf *et al*., 1998). I parametri che li caratterizzano possono, in una certa misura, ripercuotersi sul benessere e sulle performance degli animali, nonché sulla loro salute; è infatti assodato che le patologie che li affliggono sono in gran parte condizionate (Wathes e Charles, 1994). La comprensione delle modalità e della misura in cui le caratteristiche strutturali e gestionali dei ricoveri per conigli, associati alle condizioni climatiche esterne, si riflettono sui molteplici parametri che caratterizzano l'ambiente di vita dei conigli all'ingrasso, è ad oggi lacunosa. Il presente studio ha lo scopo di contribuire a migliorare la co-

noscenza di tali aspetti e di evidenziare criticità legate alla stagione o a particolari momenti della giornata.

MATERIALI E METODI

Allevamento

La struttura di allevamento sottoposta a monitoraggio è situata in provincia di Udine (Friuli Venezia Giulia) ed accoglie tre batterie di gabbie fattrice/rimonta/ingrasso per un totale di 6.600 posti ingrasso. Il ciclo produttivo è organizzato a banda unica, lo svezzamento avviene all'età di 38-40 giorni e la macellazione a circa 84 giorni. La ventilazione è forzata di tipo longitudinale, con quattro ventilatori posti in testata e aperture per l'ingresso dell'aria sulle pareti longitudinali, provviste di pannelli evaporativi per il raffrescamento estivo. Il funzionamento dei ventilatori, la regolazione delle aperture laterali ed il sistema di raffrescamento sono automatizzati per mezzo di una centralina elettronica programmabile e di sonde di temperatura. Monitoraggio. Il monitoraggio ha interessato quattro cicli d'ingrasso svolti nei periodi invernale (gennaio e febbraio, C_I), primaverile (aprile e maggio, C_{II}), estivo (luglio e agosto, C_{III}) e autunnale (ottobre e novembre, C_{IV}). Per ciascun ciclo il monitoraggio, di durata settimanale, è avvenuto in due periodi distinti: post-svezzamento (S_1, circa 1 settimana dopo l'allontanamento della fattrice) e pre-macellazione (S_2, circa 10 giorni prima del carico degli animali). Durante tale periodo sono stati rilevati in continuo i parametri microclimatici (temperatura interna ed esterna, $T°_{int}$ e $T°_{est}$ e umidità relativa, U.R.) e le concentrazioni dei gas (CO_2, NH_3, CH_4). Altri parametri, quali la qualità microbiologica dell'aria (spore fungine totali, spore di dermatofiti, *Pasteurella multocida* e *Staphylococcus aureus*), la concentrazione di polveri totali e di H_2S, la velocità e la portata di ricambio dell'aria, sono stati invece rilevati manualmente il primo e l'ultimo giorno di ciascun periodo di monitoraggio. Infine, il primo giorno di ogni settimana di monitoraggio e alla macellazione sono stati rilevati, su un campione di 60 animali, i pesi medi unitari. Nel dettaglio, le metodologie applicate sono state descritte in un precedente lavoro (Bonci *et al*., 2010).

RISULTATI E CONCLUSIONI

Parametri microclimatici

In condizioni invernali, primaverili ed autunnali, le $T°_{int}$ hanno manifestato valori omogenei e costanti, con limitate escursioni termiche. La $T°_{int}$ media dei periodi invernali è risultata pari a 12,7-13,1°C, con escursioni giornaliere inferiori a 2,5°C, pur in presenza di $T°_{est}$ minime di -3,0°C. In primavera ed autunno la $T°_{int}$ media è risultata compresa tra 17,6 e 21,0°C, con escursioni termiche giornaliere massime di 5,5°C ed in presenza di $T°_{est}$ medie comprese tra 10,5 e 15,9°C. Durante il periodo estivo, come atteso, le $T°_{int}$ medie si sono "allineate" sulle $T°_{est}$, con una media del periodo più critico pari a 27,1°C. L'U.R. dell'aria interna ha evidenziato una sensibile dipendenza dalle condizioni ambientali esterne; mediamente essa è risultata varia-

bile tra 55,0 e 70,7% (valori massimi in estate, valori minimi in primavera ed autunno). La portata d'aria di ricambio in condizioni invernali è risultata pari a circa 3.000 m^3/h (1,4 ricambi/ora), in condizioni estive ha raggiunto valori massimi pari a circa 70.000 m^3/h (>30 ricambi/ora, corrispondenti a circa 4 m^3/h/kg di peso vivo). La variabilità delle portate di ventilazione ha influito significativamente sulle concentrazioni interne di gas nocivi.

Parametri relativi alla qualità dell'aria

Per quanto riguarda l'NH_3, in inverno si sono registrati sia le concentrazioni più elevate, con una media di periodo di 22 ppm durante S_1 e di 18 ppm durante S_2, che il massimo scarto tra il valore massimo ed il valore minimo rilevati in una singola giornata (19 ppm). In estate si sono registrati i valori medi più bassi (3 e 6 ppm nei periodi S_1 e S_2, rispettivamente). In primavera i livelli medi di NH_3 sono risultati di 7 ppm (S_1) e 9 ppm (S_2), mentre in autunno si sono registrati valori leggermente superiori: 11 ppm (S_1) e 12 ppm (S_2). Su base giornaliera, la concentrazione di NH_3 ha presentato i valori massimi dalle ore 00:00 alle ore 12:00 nei periodi S_1 di tutte le stagioni; tale andamento giornaliero è stato anche rilevato, in alcuni casi, da Sanz (2008). Nei periodi S_2, l'andamento giornaliero della concentrazione di NH_3 è stato più variabile, in particolare evidenziando oscillazioni più repentine nei periodi primaverili e autunnali (C_{II} e C_{IV}). Per quanto riguarda la CO_2, le concentrazioni medie più elevate si sono registrate in inverno ed in autunno (1.550 ppm in C_I S_1, 1.610 ppm in C_I S_2, 1.180 ppm ppm in C_{IV} S_1 e 960 ppm in C_{IV} S_2) e le più basse in estate ed in primavera (600-700 ppm in C_{III} e 800-900 ppm in C_{II}). Per quanto riguarda il CH_4, le concentrazioni medie più elevate si sono registrate in estate (C_{III}), in inverno (C_I), e nella S_2 del periodo primaverile (C_{II}), mantenendosi tra 0,3 e 13 ppm. Le concentrazioni di H_2S raramente hanno superato 0,2 ppm nelle ore di permanenza in allevamento. In particolare le concentrazioni più elevate sono state registrate in concomitanza con l'attivazione dei raschiatori, in maniera simile a quanto avviene nel caso dell'NH_3, come evidenziato da altri (Aubert *et al.*, 2009). Il livello delle polveri totali è risultato più basso in C_{II} e C_{III} (primavera e estate) con valori inferiori a 0,7 mg/m^3 e leggermente più elevato in C_I e C_{IV} (inverno e autunno), senza tuttavia mai superare il valore di 1,6 mg/m^3. La carica batterica totale e la carica fungina totale non sono mai state superiori a 2.200 UFC/m^3 e 3.100 UFC/m^3 rispettivamente. Tra i batteri patogeni *P. multocida* è stato quello riscontrato nell'aria in concentrazioni più elevate (fino a 532 UFC/m^3), progressivamente crescenti dal C_{II} al C_{IV}, in particolare nella S_2 e sembra che tale parametro, al contrario di quelli gassosi, non sia stato influenzato dalla ventilazione, bensì, verosimilmente, da una crescente incidenza delle forme respiratorie. *S. aureus* è stato rilevato in limitate concentrazioni. La presenza di dermatofiti (*Microsporum canis*) nell'aria è stata riscontrata in tutti i cicli, a concentrazioni basse nei C_{II}, C_{III} e C_{IV} (<100 UFC/m^3) e leggermente più elevate nel periodo invernale (C_I). Lo schema di monitoraggio applicato in questo studio ha permesso di individuare alcune criticità legate al periodo invernale, ai periodi notturni o della prima parte della giornata e ai momenti di rimozione delle deiezioni. Tali evidenze suggerirebbero la necessità di adeguare in modo puntuale e preciso la ventilazione in questi momenti, per ottimizzare le condizioni ambientali

ed in ultima analisi, contenere le problematiche sanitarie. Infine, come già proposto da Cerioli *et al*. (2008), i parametri ambientali, assieme ad altri, possono concorrere in modo efficace alla valutazione del benessere animale.

Questo studio è stato realizzato grazie al finanziamento del Ministero della Salute nell'ambito del progetto di ricerca corrente IZSVe 01/08 "Valutazione di alcuni parametri ambientali in allevamenti di conigli da carne e correlazioni col benessere animale".

BIBLIOGRAFIA

Aubert, C., Greffard, B., Amand, G., Ponchant, P., 2009. Elevage cunicole et environnement. In: Proc. 13èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, Francia, pp. 68-79.

Bonci, M., da Borso, F., Mezzadri, M., Teri, F., Bano, L., Drigo, I., Mazzolini, E., Agnoletti, F., 2010. Sviluppo di un protocollo per la valutazione della qualità dell'ambiente nell'allevamento intensivo del coniglio: fasi preliminari. In: Atti del XII Convegno Nazionale S.I.Di.L.V., Genova, pp. 154-155.

Cerioli, M., Brivio, R., Grilli, G., Tittarelli, C., Marasciulo, V., Lavazza, A., 2008. Search for key health and welfare indicators for meat rabbit production and definition of a score method of evaluation. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 915-919.

Hartung, J., Phillips, V.R., 1994. Control of Gaseous Emissions from Livestock Buildings and Manure Stores. J. Agr. Eng. Res. 57:173-189.

Sanz, S.C., 2008. Experimental studies on gas and dust emissions to the atmosphere in rabbit and broiler buildings. PhD Thesys, Universidad Politécnica de Valencia. Seedorf, J. *et al*., 1998. Temperature and moisture conditions in livestock buildings in northern europe. J. Agr. Eng. Res. 70:49-57.

Wathes, C.M., Charles, D.R., 1994. Livestock Housing, CAB International, Wallingford, UK, pp. 25-48 and pp. 123-148.

STUDIO QUANTITATIVO DELLA CONTAMINAZIONE FUNGINA DELL'ARIA IN DIVERSE TIPOLOGIE DI ALLEVAMENTI DI CONIGLI E PROPOSTA DI UN METODO DI CAMPIONAMENTO STANDARDIZZATO

BONCI M., MAZZOLINI E., BANO L., DRIGO I., AGNOLETTI F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Treviso, Italy
Michela Bonci, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Treviso,
Viale Brigata Treviso 13/a, 31100 Treviso (TV), Italy - Tel. +39 0422 302302 - Fax: +39 0422 421154
*Corresponding author: mbonci@izsvenezie.it

ABSTRACT

Quantitative study of air contamination by fungal spores in different kinds of rabbit farms and proposal of a standardized sampling method

In order to establish the most suitable and reliable sampling method for the assessment of air contamination by spores of environmental and pathogenic fungi inside rabbit farms, six farms, equipped with different ventilation systems, characterized by various levels of hygiene and with a history of mycosis, were selected for samples collection. In each farm samples were collected in four occasions at different heights and points and, for one day, at four times. The statistical analysis of the data collected allowed to suggest the following sampling schedule to reliably estimate the average contamination level: one sampling point per corridor, at a height of 0-2 m for environmental fungi and 1-2 m for dermatophytes, once in a day.

Key words: Rabbit farms, Air quality, Fungal spores, Sampling method.

INTRODUZIONE

La qualità dell'aria nei ricoveri per animali risente, tra l'altro, della contaminazione da spore fungine rilasciate da vari tipi di miceti, sia ambientali che associati come saprofiti o commensali agli animali e all'uomo, sia patogeni primari, soprattutto nell'allevamento del coniglio in cui la micosi è un problema sanitario estremamente diffuso (Torres Rodríguez *et al*., 1992; Cafarchia *et al*., 2010). Oltre a compromettere il benessere e le performance del coniglio, la micosi ha risvolti di sanità pubblica in quanto *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*, le specie di dermatofiti isolate da coniglio, sono agenti di zoonosi a cui sono esposti coloro che per motivi professionali vengono a contatto con animali infetti, come allevatori e macellatori (Romano, 1999; De La Torre *et al*., 2003). La contaminazione fungina dell'aria in allevamenti di conigli è un argomento che è già stato affrontato (Martino *et al*., 2007; Cafarchia *et al*., 2010), non si è tuttavia mai preso in considerazione come le cariche ambientali di spore fungine possano variare al variare del sito e

del momento in cui si effettua il campionamento, informazioni utili che potrebbero contribuire ad una corretta valutazione oggettiva della qualità dell'aria negli allevamenti di specie d'interesse zootecnico. Obiettivi del presente studio sono stati pertanto quelli di valutare la varianza imputabile a tali fattori, con lo scopo di definire una modalità di campionamento standardizzata applicabile in campo che dia risultati attendibili e confrontabili.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale e campionamento

Per stimare in che misura l'allevamento, il sito di campionamento all'interno dell'edificio (nel senso sia della lunghezza che della larghezza) e l'altezza del punto di campionamento incidono sulla varianza della concentrazione di spore fungine totali (FT) e di spore di dermatofiti (D), sono stati selezionati 6 allevamenti, all'interno dei quali sono stati eseguiti prelievi in punti fissi di ciascun corridoio, distanziati tra loro di 6-7 metri, in quattro distinti sopralluoghi e, per quattro volte, prelievi a tre diverse altezze dello stesso punto (a terra, a 1m e a 2m). Per stimare in che misura il momento del prelievo, nell'arco della giornata, incide sulla varianza della concentrazione di FT e D, sono stati prelevati campioni d'aria in un unico punto per corridoio, scelto in modo casuale, alle ore 9:00, 12:00, 15:00 e 18:00 di una stessa giornata. Mentre in concomitanza di quest'ultimo sopralluogo in allevamento si svolgevano le previste pratiche quotidiane, in concomitanza dei precedenti non era svolto alcun tipo di attività per evitare interferenze delle stesse sui rilievi.

Allevamenti

Le caratteristiche degli allevamenti inseriti nello studio sono riportate nella tabella 1; requisito imprescindibile era il fatto di non ricorrere all'uso di disinfettanti ad azione antifungina tramite nebulizzazione, per evitare la raccolta di dati viziati dagli effetti di abbattimento della carica ambientale di spore fungine conseguenti a tale pratica.

Esame microbiologico

I campioni d'aria sono stati prelevati col campionatore portatile SAS Super 100® (PBI International), utilizzando Sabouraud Dextrose agar addizionato con cloramfenicolo (SCA) per i FT e Mycobiotic agar (MA) per i D ed individuando per entrambi, mediante prove preliminari, un volume pari a 20 l di aria. Le piastre erano ispezionate dopo 5 (SCA) o 7 (MA) giorni d'incubazione a temperatura ambiente per la conta delle colonie e, nel caso dei soli D, per l'identificazione sulla base delle caratteristiche macroscopiche e microscopiche. Le cariche erano espresse come unità formanti colonia/m^3 di aria (UFC/m^3).

Analisi statistica

L'associazione tra le cariche dei FT e quelle dei D è stata valutata con l'analisi di varianza (ANOVA) e con un modello di regressione lineare, previa normalizzazione

delle distribuzioni di frequenza delle cariche di FT e D mediante trasformazione logaritmica. L'influenza dell'altezza del punto di prelievo e del momento del prelievo nell'arco della giornata sulla concentrazione di FT e D è stata valutata mediante il calcolo della media dei valori rilevati e della deviazione standard.

Tabella 1 – Caratteristiche degli allevamenti inseriti nello studio.

	Allevamento					
	1	2	3	4	5	6
Lunghezza, m	36	70	60	50	47	50
Larghezza, m	13	12	12	12	15	13
Area, m^2	468	840	720	600	705	650
Ventilazione	Naturale	Longitudinale	Trasversale	Trasversale	Longitudinale	Naturale
Tipologia	Riproduzione/ ingrasso	Riproduzione	Riproduzione/ ingrasso	Ingrasso	Riproduzione/ ingrasso	Riproduzione
Rimozione deiezioni	Giornaliera	Accumulo	Giornaliera	Giornaliera	3 volte a settimana	Giornaliera
Livello di igiene	Buono	Scarso	Buono	Buono	Scarso	Buono

RISULTATI E CONCLUSIONI

Dall'ANOVA e dal modello di regressione lineare è emerso che le concentrazioni delle spore, sia di FT che di D, sono in primo luogo influenzate dall'allevamento e che la distribuzione delle spore di FT non è associata ai corridoi. Non è stato evidenziato alcun gradiente nella concentrazione delle spore di FT, né in senso trasversale, né in senso longitudinale, come si potrebbe supporre in relazione al tipo di ventilazione (trasversale, longitudinale, naturale) ed al conseguente presunto "tragitto" del flusso dell'aria nel capannone, che pertanto non sembra influenzare la dispersione delle spore. Nel caso delle spore di D l'ANOVA e il modello di regressione lineare hanno evidenziato un certo grado di correlazione del livello di contaminazione con alcuni corridoi. Per quanto riguarda l'influenza dell'altezza del punto di prelievo sulla varianza della concentrazione di spore fungine, dal confronto tra le medie dei valori registrati a diverse altezze e tra queste e la media complessiva, è emerso che la concentrazione di FT non sembra correlata con l'altezza mentre quella di D è nettamente superiore a 1-2 m d'altezza rispetto a quella rilevata ad altezza pavimento. E' ragionevole supporre che tale differenza sia dovuta alla presenza, a 1-2 m di altezza, delle gabbie e quindi dei conigli, potenziali ospiti dei dermatofiti di cui rilasciano le spore. Infine, sulla base dei dati derivanti dai campioni prelevati in diversi momenti, si può affermare in linea generale che le cariche di FT e D sono piuttosto omogenee nell'arco della giornata. I risultati di questo studio, che affronta per la prima volta con un approccio statistico il tema delle modalità di campionamento dell'aria negli allevamenti di conigli, suggeriscono quanto segue. Per stimare il livello medio di contaminazione da FT si possono prelevare campioni di 20 l d'aria con SAS Super 100® in un punto qualsiasi di ognuno dei corridoi, ad un'altezza compresa tra 0 e 3 metri, in occasione di un unico sopralluogo in alleva-

mento. In caso di una contaminazione ambientale attesa particolarmente elevata si suggerisce di ridurre il volume d'aria per limitare il rischio di ottenere piastre inutilizzabili a causa della confluenza delle colonie. Il grado medio di contaminazione può essere quindi rappresentato in maniera sufficientemente adeguata dalla media aritmetica delle cariche dei singoli campioni, espressa come UFC/m^3. Per stimare il livello medio di contaminazione da D si possono prelevare campioni di 20 l d'aria con SAS Super 100®, in un punto per ciascun corridoio, ad un'altezza di 1-2 m, in occasione di un unico sopralluogo in allevamento. Nella scelta dei singoli siti di campionamento è preferibile privilegiare i punti in corrispondenza di gabbie in cui si trovano animali con lesioni, visto che sembra che la distribuzione delle spore di D sia in una certa misura legata alla posizione degli animali malati. Nel caso dei D potrebbe essere opportuno aumentare il volume di aria o fare prelievi aggiuntivi per aumentare la sensibilità, soprattutto in caso di micosi lieve o scarsamente diffusa. Anche in questo caso la media aritmetica delle cariche dei singoli prelievi espressa in UFC/m^3, può rappresentare in modo sufficientemente adeguato il livello medio di contaminazione da D dell'allevamento.

Questo studio è stato realizzato grazie al finanziamento del Ministero della Salute nell'ambito del progetto di ricerca corrente IZSVe 01/08 "Valutazione di alcuni parametri ambientali in allevamenti di conigli da carne e correlazioni col benessere animale".

BIBLIOGRAFIA

Cafarchia, C., Camarda, A., Coccioli, C., Figueredo, L.A., Circella, E., Danesi, P., Capelli, G., Otranto, D., 2010. Epidemiology and risk factors for dermatophytoses in rabbit farms. Med. Mycol. 48:975-980.

De La Torre, A.M., Cuenca-Estrella, M., RodrÍguez-Tudela, J.L., 2003. Estudio epidemiológico sobre las dermatofitosis en España (abril-junio 2001). Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 21:477-483.

Martino, P.A., Luzi, F., Verga, M., 2007. Fungal environment in different rabbit intensive farms. Ital. J. Anim. Sci. 6(Suppl. 1):774-776.

Romano, C., 1999. Tinea capitis in Siena, Italy. An 18-year survey. Mycoses 42:559-562.

Torres-Rodríguez, J.M., Dronda, M.A., Rossell, J., Madrenys, N., 1992. Incidence of dermatophytoses in rabbit farms in Catalonia, Spain, and its repercussion on human health. Eur. J. Epidemiol. 8:326-329.

EFFETTO DEL TIPO DI GABBIA SU ALCUNI ASPETTI FISIOLOGICI, COMPORTAMENTALI E PRODUTTIVI DELLA CONIGLIA FATTRICE

MUGNAI C.[1], CARDINALI R.[1], MOSCATI L.[2], DAL BOSCO A.[1], CASTELLINI C.[1]

[1]*Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia, Italy*
[2]*Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche, Perugia, Italy*
Alessando Dal Bosco, Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia,
Borgo XX Giugno, 74, 61121 Perugia, Italy - Tel. +39 075 5857110 - Fax: +39 075 5857122
*Corresponding author: dalbosco@unipg.it

ABSTRACT

Effect of housing system on some physiological, behavioural and productive aspects of rabbit doe

The aim of the study was to ascertain if a higher space availability (alternative cage system) modifies physiological, behavioural and productive parameters of rabbit does. Sixteen pregnant New Zealand White nulliparous rabbit does were transferred to standard cages (n=8) or to alternative cages (n=8) and physiological, behavioural and productive traits were recorded for three consecutive cycles. Behavioural observations showed both in *pre-partum* and *post-partum* periods a higher presence of stereotyped behaviour in standard caged doe. On the contrary in alternatively caged doe, even if blood ROS were higher due to their greater motor activity, a lower haematic value of haptoglobin was reached, thus was accompanied by a lower pre weaning mortality of kits. In conclusion giving to does a higher space availability could permit to enhance animal welfare and reduce the pre-weaning pups mortality.

Key words: Housing system, Behaviour, Performance, Rabbit doe.

INTRODUZIONE

Le direttive comunitarie in tema di riproduzione prevedono che le fattrici debbano essere allevate in coppia o in gruppo e che abbiano la possibilità di interazioni sociali all'interno di un ambiente arricchito. L'allevamento in gruppo (Stauffacher, 1992), in gabbie modificate (Mirabito, 2003) e in parchetto, però, può essere considerato accettabile solo per le giovani coniglie nullipare o per le coniglie in asciutta; durante la fase riproduttiva, infatti, la gestione degli animali risulta molto più difficile per il verificarsi di numerosi problemi (Dal Bosco *et al*., 2004; Mugnai *et al*., 2009). In relazione alle dimensioni delle gabbie convenzionali, è stato evidenziato che le fattrici, a causa dell'ipoplasia sistemica dei tessuti ossei generata dalla ridotta possibilità di movimento e del prolungato *flat-sitting*, presentano spesso uno sviluppo scheletrico anomalo, che può determinare importanti infermità. Essendo or-

mai noto il forte legame esistente tra comportamento animale, stress e sistema immunitario, lo scopo del presente lavoro è stato quello di verificare come l'aumento di spazio disponibile influisca su alcuni parametri comportamentali, fisiologici e produttivi delle coniglie fattrici.

MATERIALE E METODI

La sperimentazione è stata effettuata presso lo stabulario sperimentale del Dipartimento di Biologia Applicata dell'Università degli Studi di Perugia, dove 16 coniglie nullipare di razza Bianca di Nuova Zelanda sono state divise in due gruppi omogenei e, 7 giorni prima del parto, assegnate ai seguenti sistemi di allevamento: gabbia standard monocellulare (38 × 60 × 34 cm; 0,23 m^2/capo) e gabbia alternativa monocellulare (48 × 65 × 60 cm; 0,31 m^2/capo). Le fattrici a 4 mesi di età sono state sottoposte a inseminazione artificiale (I.A.). Dopo il parto è stato praticato l'allattamento controllato nei primi 16 giorni e allo svezzamento (30 giorni), le coniglie sono state di nuovo sottoposte a I.A. Le osservazioni comportamentali sono state eseguite secondo la metodologia applicata in precedenti sperimentazioni (Mugnai *et al*., 2009), dal giorno 7 al 4 *pre-partum* e per 15 giorni nel periodo *post-partum*. La mattina precedente e successiva al parto sono state registrate le caratteristiche quali-quantitative del nido (Canali *et al*., 1991). I prelievi ematici sono stati effettuati allo svezzamento dei coniglietti per la determinazione dei Metaboliti Reattivi all'Ossigeno (ROS), del Potere Antiossidante del plasma (PAO) (kit commerciali Diacron, Grosseto, Italia) e dell'aptoglobina (kit enzimatico Phase TM Aptoglobina, Celbio srl, Milano). Non essendo state osservate differenze significative tra i cicli di allevamento considerati, i dati comportamentali sono stati raggruppati ed elaborati collettivamente. L'analisi statistica è stata effettuata con il software Stata (StataCorp, 2005).

RISULTATI E CONCLUSIONI

Nel periodo *pre-partum*, le coniglie allevate in gabbia standard hanno mostrato maggiori percentuali di stereotipie rispetto alle fattrici in gabbia alternativa (Figura 1). Questo rilievo conferma che l'allevamento in gabbia standard preclude l'espressione di alcuni comportamenti basilari (Gunn-Dore e Morton, 1993); nelle fattrici allevate in gabbia alternativa, invece, le frequenze delle attività tipiche di questo periodo, quali il comfort e il riposo, sono risultate superiori. La qualità complessiva del nido non ha fatto registrare differenze significative nei due gruppi a conferma dell'ottima attitudine materna della razza Bianca di Nuova Zelanda. Per ciò che concerne le osservazioni comportamentali *post-partum*, il giorno di osservazione non ha fatto registrare differenze significative (Tabella 1). Come nelle osservazioni *pre-partum*, nelle fattrici allevate in gabbia standard sono state determinate superiori percentuali di stereotipie e comfort, mentre le fattrici allevate in gabbia alternativa hanno presentato le maggiori percentuali di movimento e riposo. Le stesse hanno presentato le migliori prestazioni riproduttive svezzando tutti i coniglietti; tale dato, a fronte di una

produzione lattea simile, ha fatto si che il latte pro-capite fosse minore come i pesi dei coniglietti allo svezzamento.

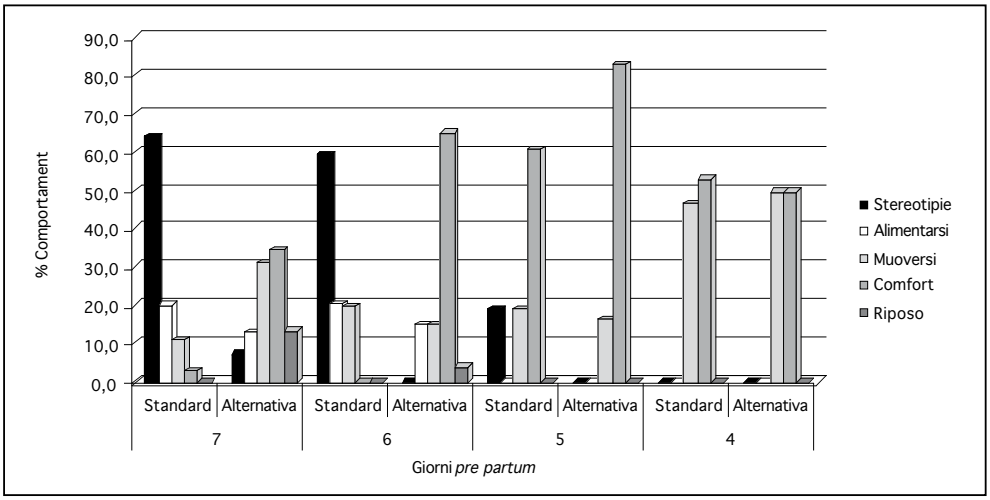

Figura 1 – Effetto del tipo di gabbia sul comportamento pre-partum delle coniglie (8 animali/gruppo).

Tabella 1 – Effetto del tipo di gabbia sul comportamento post-partum, sullo stato ossidativo e sui parametri produttivi (8 animali/gruppo; 3 cicli).

Tipo di gabbia		Standard	Alternativa	DSE
Stereotipie	%	13,2[b]	0,0[a]	8,1*
Alimentarsi	%	0,0	0,0	0,0*
Muoversi	%	38,2[a]	47,8[b]	7,1*
Comfort	%	35,8[b]	30,1[a]	4,8*
Riposo	%	12,8[a]	22,1[b]	16,2*
ROS	mmol H_2O_2	7,0[a]	8,3[b]	0,9
PAO	µmol di HCLO	159,4[b]	148,4[a]	7,7
Aptoglobina	mg/ml	0,4[b]	0,1[a]	0,2
Peso fattrice al parto	g	4050,0	4005,0	35,0
Peso fattrice allo svezzamento	g	3900,0	3990,0	60,0
Nati vivi	n	8,0	8,0	2,0
Latte prodotto (primi 15 d)	g	2085,2	2070,4	10,6
Latte/coniglietto (primi 15 d)	g/d	24,0[b]	17,2[a]	4,8
Svezzati	n	6,0[a]	8,0[b]	2,1
Peso coniglietti svezzamento	g	881,2[b]	645,4[a]	166,8
Mortalità pre-svezzamento*	%	37,5[b]	0,0[a]	5,5*

[a,b]: $P<0,05$. * = χ^2

I livelli di ROS e PAO plasmatici hanno evidenziato una minor stabilità ossidativa delle coniglie allevate in gabbia alternativa. La causa di tali riscontri è probabilmente legata alla maggior disponibilità di spazio che ha permesso a queste coniglie di espletare una maggiore attività motoria, ipotesi confermata dai rilievi comportamentali. I valori di aptoglobina più bassi sono stati osservati nel gruppo sperimentale; tale riscontro è probabilmente imputabile ad minor stress, confermato dall'assenza di stereotipie. In conclusione si può affermare che le fattrici allevate in gabbia alternativa hanno avuto la possibilità di espletare una gamma di comportamenti più complessa, così da determinare un maggior grado di benessere. Tale situazione, seppur necessitando di ulteriori approfondimenti, ha permesso anche di contrastare l'insorgenza di processi infiammatori sub-clinici e di ridurre la mortalità pre-svezzamento.

BIBLIOGRAFIA

Canali, F., Ferrante, V., Todeschini, R., Verga, M., Carenzi, C., 1991. Rabbit nest construction and its relationship with litter development. Appl. Anim. Behav. Sci. 31:259-265.

Dal Bosco, A., Mugnai, C., Castellini, C., Laudazi, S., 2004. A prototype of colony cage for improving the welfare of rabbit does: Preliminary results. In: Proc. 8th World Rabbit Congr., pp. 1229-1234.

Gunn-Dore, D., Morton, D.B., 1993. The behaviour of single-caged and group-housed laboratory rabbits. 5th Fed. Europ. Lab. Anim. Sci. Ass., pp. 80-84.

Mirabito, L., 2003. Logement et bien-être du lapin: les nouveaux enjeux. In: Proc. 10èmes Jour. Rech. Cun., Paris, pp. 163-172.

Mugnai, C., Dal Bosco, A., Castellini, C., 2009. Effect of different rearing systems and pre-kindling handling on behaviour and performance of rabbit does. Appl. Anim. Behav. Sci. 118:91-100.

StataCorp, 2005. Stata Statistical Software: Release 9.0, College Station, Texas, USA.

Stauffacher, M., 1992. Group housing and enrichment cages for breeding, fattening and laboratory rabbits. Anim. Welfare 1:105-125.

PRESTAZIONI PRODUTTIVE E RISULTATI DI MACELLAZIONE IN CONIGLI ALLEVATI IN GABBIA SINGOLA, BICELLULARE E IN COLONIA

TROCINO A.[1], TAZZOLI M.[2], MAJOLINI D.[2], XICCATO G.[2]

[1]*Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria.*
[2]*Dipartimento di Scienze Animali, Università di Padova, Italy*
Angela Trocino, Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Università di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy
Tel. +39 049 8272639 - Fax: +39 049 8272669
*Corresponding author: angela.trocino@unipd.it

ABSTRACT

Growth performance and slaughter results in rabbits reared in individual, bicellular and colony cages

From weaning until slaughter (27 to 75 d of age), 384 rabbits were kept into 72 individual cages (72 rabbits), 48 bicellular cages (2 rabbits/cage; 96 rabbits) and 24 colony cages (9 rabbits/cage; 216 rabbits). Rabbits in individual cages showed higher final weight (P=0.10), growth rate (P=0.07) and feed intake (P<0.01) compared to rabbits kept into bicellular and colony cages, but similar conversion index. Dressing percentage and carcass quality were similar apart from muscle to bone ratio of hind leg (P<0.05), higher in rabbits reared in individual cages compared to colony. On *biceps femoris* muscle, the b* index increased (P<0.001) from rabbits of individual to those of bicellular and colony cages. We can conclude that the rabbits in individual cages showed growth performance somewhat higher compared to those kept in bicellular and colony cages while slaughter results and meat quality did not differ substantially among the three housing systems.

Key words: Housing systems, Growth performance, Carcass traits.

INTRODUZIONE

L'European Food and Safety Authority raccomanda che i conigli all'ingrasso siano allevati in gruppo, in gabbie o recinti, in modo da favorire le interazioni sociali, aumentare lo spazio a disposizione del singolo animale e consentire un normale comportamento specie-specifico (EFSA, 2005). Tuttavia, l'allevamento in colonia può influenzare negativamente le prestazioni produttive e, in funzione di vari fattori quali età, densità di allevamento e dimensione del gruppo, può favorire l'aggressività tra gli animali (Trocino e Xiccato, 2006; Verga *et al*., 2007; Szendrő *et al*., 2009). Il presente studio ha inteso confrontare prestazioni produttive e risultati di macellazione in conigli allevati in gabbia singola, bicellulare e in colonia.

MATERIALI E METODI

A 27 giorni di età, 384 conigli ibridi Grimaud (612±51 g) sono stati svezzati e trasportati presso lo stabulario del Dipartimento di Scienze Animali dove sono stati collocati in tre tipi di gabbia: 72 gabbie singole (72 conigli; 25 x 40 x 30 cm; 10 animali/m^2), 48 gabbie bicellulari (96 conigli; 28 × 40 × 30 cm; 17,9 animali/m^2) e 24 gabbie collettive (colonie da 9 conigli; 216 conigli; 100 × 50 cm; 18 animali/m^2). I conigli sono stati alimentati per tutta la prova con un unico mangime commerciale da ingrasso (PG: 16,1%, NDF: 36,6%, amido 11,6%, energia digeribile: 10,1 MJ/kg) contenente coccidiostatico ma privo di antibiotici. A 75 giorni di età, 120 animali (40 per gruppo sperimentale), rappresentativi, nell'ambito di ciascun gruppo, per peso medio e variabilità, sono stati macellati presso una struttura commerciale seguendo i protocolli internazionali (Blasco *et al*., 1993). Dopo 24 ore di refrigerazione a 4°C, sui muscoli *longissimus lumborum* e *biceps femoris* sono stati misurati pH e colore CIE L*a*b* (Trocino e coll., 2003). Le carcasse di riferimento (Blasco *et al*., 1993) sono state sezionate per determinare l'incidenza del grasso separabile e degli arti posteriori e il rapporto muscoli/ossa dell'arto posteriore. I risultati sono stati sottoposti ad analisi della varianza con procedura GLM del pacchetto statistico SAS, considerando come fattore principale il sistema di stabulazione e come unità sperimentale la gabbia (prestazioni produttive) o l'animale (dati di macellazione e qualità della carne).

RISULTATI E CONCLUSIONI

Lo stato di salute è stato buono senza differenze significative tra i gruppi (2 morti in gabbia individuale, 7 in gabbia bicellulare e 1 in colonia) (Tabella 1). Gli animali allevati in gabbia individuale hanno mostrato maggiori consumi (P<0,01) e accrescimenti (P=0,07) e pesi vivi finali tendenzialmente superiori rispetto ai conigli in gabbia bicellulare e in colonia (2678 *vs*. 2619 e 2602 g; P=0,10; Tabella 1), da ascriversi in particolare ai maggiori accrescimenti (37,8 *vs*. 35,7 e 34,6 g/d; P<0,01) e consumi alimentari (155 *vs*. 147 e 144 g/d; P<0,001) registrati nel secondo periodo di prova (da 52 a 75 giorni; dati non riportati in tabella). L'indice di conversione è risultato simile nei tre sistemi di stabulazione.

Tabella 1 – Prestazioni produttive dallo svezzamento (27 d) alla macellazione (75 d) (a-b = P<0,05).

	Gabbia			Prob.	DSR
	Singola	Bicellulare	Colonia		
Peso vivo iniziale, g	614	613	612	0,98	46
Peso vivo finale, g	2678	2619	2602	0,10	177
Accrescimento, g/d	43,0	41,8	41,5	0,07	3,4
Consumo, g/d	133[a]	127[b]	126[b]	<0,01	12
Indice conversione	3,10	3,05	3,03	0,15	0,17

Le lievi differenze di peso vivo finale si sono ulteriormente ridotte al macello (Tabella 2), a causa delle minori perdite di trasporto nei conigli allevati in colonia (3,1% e 2,9% *vs.* 2,2%; P<0,001; dati non riportati in tabella). Queste potrebbero essere spiegate con il minor consumo alimentare di questi animali nelle fasi finali di allevamento e un grado di riempimento dell'apparato digerente minore alla partenza, ma simile all'arrivo al macello. Il maggiore rapporto muscoli/ossa dell'arto posteriore nei conigli in gabbia singola rispetto a quelli in colonia (6,35 *vs.* 5,90; P<0,05) potrebbe dipendere dalle lievi differenze di peso vivo. In quanto alla qualità della carne (Tabella 3), sul *longissimus lumborum* non è stata misurata alcuna variazione significativa, mentre sul *biceps femoris* la luminosità (L*) è tendenzialmente diminuita (P=0,06) e l'indice del giallo (b*) è aumentato (3,04 *vs.* 3,32 *vs.* 4,26; P<0,001) passando dagli animali allevati in gabbia singola a quelli in gabbia bicellulare e in colonia. In conclusione, l'allevamento in gabbia singola dei conigli da carne ha permesso di raggiungere prestazioni produttive tendenzialmente superiori rispetto all'allevamento dei conigli in gabbia bicellulare o in colonie da 9 animali, in termini di maggiore peso vivo finale, migliori accrescimenti e più vantaggiose caratteristiche delle carcasse. Tale risultato è dipeso in buona parte dalle migliori prestazioni nella fase finale della prova, attribuibili probabilmente al minore carico di peso vivo alla macellazione nelle gabbie individuali (27 kg/m^2) rispetto agli altri sistemi di stabulazione (circa 47 kg/m^2). Il ridotto numero di animali nelle colonie e l'analoga densità potrebbero, infine, spiegare i risultati simili evidenziati dai conigli in bicellulare e in colonia: nelle condizioni testate è ipotizzabile che gli eventi stressanti siano stati contenuti nelle colonie e che gli animali abbiano avuto la possibilità di esprimere adeguatamente il loro repertorio comportamentale.

Tabella 2 – Risultati di macellazione (a-b = P<0,05).

	Gabbia			Prob.	DSR
	Singola	Bicellulare	Colonia		
Peso vivo al macello (PV), g	2633	2574	2569	0,14	156
Tubo digerente, % PV	17,7	17,5	17,4	0,60	1,3
Carcassa fredda, g	1617	1587	1571	0,16	107
Resa a freddo, % PV	61,4	61,6	61,1	0,29	1,3
Carcassa riferimento (CR), g	1360	1342	1336	0,52	97
Grasso separabile, % CR	3,0	3,2	2,9	0,45	0,9
Arti posteriori, % CR	33,3	33,9	33,5	0,06	0,8
Rapporto M/O arto posteriore	6,35^{b}	6,19^{ab}	5,90^{a}	0,02	0,50

Tabella 3 – pH e colore determinati sul longissimus lumborum e sul biceps femoris (a-b = P<0,05).

	Gabbia			Prob.	DSR
	Singola	Bicellulare	Colonia		
Longissimus lumborum					
pH	5,68	5,71	5,72	0,23	0,11
L*	53,3	53,6	52,5	0,19	0,26
a*	-2,09	-2,25	-1,86	0,12	0,83
b*	2,73	1,72	2,35	0,11	2,13
Biceps femoris					
pH	5,92	5,95	5,96	0,12	0,10
L*	50,7	50,0	49,5	0,06	2,3
a*	-2,24	-2,11	-2,33	0,29	0,66
b*	3,04[a]	3,32[a]	4,26[b]	0,001	1,48

Gli autori ringraziano il Dott. Andrea Zuffellato, Veronesi Verona S.p.A., per l'assistenza tecnica.

BIBLIOGRAFIA

Blasco, A., Ouhayoun, J., Masoero, G., 1993. Harmonization of criteria and terminology in rabbit meat research. World Rabbit Sci. 1:3-10.

EFSA, 2005. The impact of the current housing and husbandry systems on the health and welfare of farmed domestic rabbit (EFSA-Q-2004-023). EFSA J. 267:1-31.

Szendrő, Zs., Princz, Z., Romvári, R., Locsmándi, L., Szabó, A., Bázár, Gy., Radnai, I., Biró-Németh, E., Matics, Zs., Nagy, I., 2009. Effect of group size and stocking density on productive, carcass, meat quality and aggression traits of growing rabbits. World Rabbit Sci. 17:153-162.

Trocino, A., Xiccato, G., 2006. Animal welfare in reared rabbits: a review with emphasis on housing systems. World Rabbit Sci. 14:77-93.

Trocino, A., Xiccato, G., Queaque, P.I., Sartori, A., 2003. Effect of transport duration and gender on rabbit carcass and meat quality. World Rabbit Sci. 11:32-43.

Verga, M., Luzi, F., Carenzi, C., 2007. Effects of husbandry and management systems on physiology and behavior of farmed and laboratory rabbits. Horm. Behav. 52:122-129.

Sessione Patologia

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E RESISTENZA ANTIMICROBICA DI *SALMONELLA* SER. TYPHIMURIUM DA ALLEVAMENTI CUNICOLI DELL'ITALIA MERIDIONALE

CAMARDA A.[1], PUGLIESE N.[1], PUPILLO A.[2], CIRCELLA E.[1], RICCI M.[3], PAZZANI C.[2]

[1]*Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia.*
[2]*Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Italy.*
[3]*Agenzia Regionale Per l'Ambiente, U.O. Microbiologia degli Alimenti e Bevande, Brindisi, Italy*
Antonio Camarda, Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi di Bari,
Strada provinciale per Casamassima Km 3, 70010 Valenzano - Bari, Italy - Tel./Fax: +39 080 4679910
*Corresponding author: a.camarda@veterinaria.uniba.it

ABSTRACT

Molecular characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* Typhimurium from rabbit farms in Southern Italy

Salmonella enterica infection is quite uncommon in rabbits, but it may raise serious concerns in terms of economic losses and public health impact. Furthermore, the insurgence and diffusion of multidrug resistant strains complicate the management of both human and rabbit infection. In this study four *S.* Typhimurium strains were characterized for antimicrobial susceptibility, resistance genes, class 1 integrons and Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). The results showed the circulation of a group of strain which is indistinguishable from human isolates for PFGE and multidrug resistance patterns. Our data suggest that molecular characterization is an useful tool to promptly recognize *Salmonella* strains which are potentially harmful to rabbits or humans.

Key words: S. Typhimurium, PFGE, Multidrug resistance, Resistance genes.

INTRODUZIONE

Le salmonellosi non rappresentano nel settore cunicolo un problema patologico rilevante. I report sulla diffusione della malattia evidenziano, infatti, una prevalenza ridotta di questa forma morbosa negli allevamenti. Tuttavia, spesso la presenza di *Salmonella* si traduce in perdite economiche rilevanti sia per gli effetti diretti sulla salute degli animali, sia per le implicazioni di polizia veterinaria e sanità pubblica. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium (*S.* Typhimurium) è il sierotipo più temuto, sia per la gravità della sintomatologia cunicola, sia perché causa di tossinfezioni alimentari umane (Dionisi *et al.*, 2009). L'ampia diffusione di ceppi multiresistenti desta grande preoccupazione, perché complicano l'eradicazione negli allevamenti e il trattamento terapeutico nell'uomo. Scarsi sono al momento i dati sulle

caratteristiche fenotipiche e genotipiche dei ceppi di *S*. Typhimurium isolati nel coniglio, probabilmente proprio a causa di una sottovalutazione del problema in questo settore. In questo lavoro alcuni ceppi di *S.* Typhimurium isolati da allevamenti di coniglio nel corso di focolai di malattia sono stati genotipizzati. I risultati ottenuti hanno offerto lo spunto per riflessioni circa le connessioni possibili tra i ceppi circolanti negli allevamenti cunicoli e quelli responsabili di tossinfezioni alimentari nell'uomo.

MATERIALI E METODI

Le ricerche sono state condotte su n. 4 stipiti di *S.* Typhimurium isolati da altrettanti allevamenti industriali di coniglio in Puglia e Basilicata tra il 1999 e il 2003 durante focolai epidemici di malattia. I ceppi sono stati fagotipizzati, la suscettibilità agli antibiotici AMP, CHL, ENR, GEN, KAN, NAL, STR, SMX, TET, TMP è stata determinata mediante diffusione su disco secondo le prescrizioni del CLSI (2006) e sono stati allestiti incroci di coniugazione. Le PCR sono state eseguite con oligonucleotidi specifici per l'isola genomica SGI-1, gli integroni di classe 1 ed i geni di resistenza. I prodotti sono stati clonati in pGEM-T Easy Vector (Promega, Milano). I plasmidi ricombinanti sono stati purificati e l'inserto è stato sequenziato. Le sequenze nucleotidiche sono state analizzate mediante le applicazioni BLAST. La caratterizzazione mediante PFGE è stata eseguita secondo il protocollo descritto da Ribot *et al.* (2006). I profili ottenuti sono stati confrontati con quelli presenti nella banca dati di PulseNet Europa e denominati secondo la nomenclatura standard.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Le caratteristiche dei ceppi di *S.* Typhimurium studiati sono riportati in tabella 1. La fagotipizzazione ha evidenziato una certa eterogeneità tra gli isolati, due dei quali risultavano appartenere al fagotipo DT12, e gli altri due invece rispettivamente a DT104 e DT208. Tuttavia, i due ceppi DT12 e il DT104 esibivano lo stesso profilo di PFGE, denominato STYMXB.0061. I tre ceppi erano accomunati anche da un punto di vista geografico, considerato che provenivano tutti da allevamenti lucani. Diversamente, il ceppo DT208, isolato nella provincia di Lecce, era caratterizzato dal profilo PFGE STYMXB.0110. L'analisi della suscettibilità agli agenti antimicrobici evidenziava che tutti i ceppi erano sensibili ad ENR e GEN, ma, mentre il ceppo DT208 era resistente a STR, SMX e TET, i ceppi DT12 e DT104 erano resistenti a AMP, CHL, STR, SMX e TET. Questi ultimi tre possedevano l'isola genomica SGI-1, che, a sua volta, recava l'informazione genetica necessaria per la multiresistenza. Su di essa erano infatti localizzati i geni *floR*; *sul1*; *tetA*(G), *aadA2*; bla_{PSE-1}, che determinavano, rispettivamente, la resistenza a CHL, SMX, TET, STR e AMP. Inoltre è stato possibile stabilire che i geni *aadA2* e bla_{PSE-1} rappresentavano cassette geniche inserite in un integrone di classe 1. Anche il genoma del ceppo DT208 ospitava un integrone di classe 1, in cui era inserita una cassetta genica *aadA1*, che determina, come *aadA2*, l'inattivazione della STR. Il ceppo DT208 inoltre, era resistente al

SMX in quanto dotato di 2 geni, *sul1,* riscontrati anche negli altri tre ceppi esaminati, e *sul2*. Questo ceppo, inoltre, differiva dagli altri anche perché portatore del gene *tetA*(C) (invece di *tetA*(G)*)* il quale era fiancheggiato, a monte e a valle, da due trasposoni semplici IS*26*. La ricerca di elementi coniugativi nei ceppi in esame ha dato esito negativo nei ceppi DT12 e DT104. Al contrario, nel genoma del ceppo DT208 sono stati individuati due plasmidi. È attualmente in fase di accertamento l'eventuale associazione tra questi e i geni di resistenza.
Il presente studio descrive retrospettivamente 4 ceppi di *S.* Typhimurium isolati da allevamenti cunicoli di Puglia e Basilicata, osservandone una stretta correlazione con isolati di origine umana. Infatti, il pulsotipo STYMXB.0061, caratterizzante i due ceppi DT12 e il DT104 qui esaminati, coincide con un profilo che era predominante in Europa tra il 2000 e il 2004, ma che in Italia era stato riportato assai sporadicamente (Gatto *et al.*, 2006). Tuttavia, pochi anni più tardi lo stesso profilo caratterizzava il 30% degli isolati italiani responsabili di salmonellosi nell'uomo (Dionisi *et al.,* 2009). Inoltre, i tre ceppi STYMXB.0061 esaminati nel presente studio erano caratterizzati da un profilo di multiresistenza AMP-CHL-STR-SMX-TET, dalla presenza dell'isola genomica SGI-1 e dei geni di resistenza *floR*; *sul1*; *tetA*(G), *aadA2*; bla_{PSE-1}. Inoltre, questi ultimi due facevano parte di un integrone di classe 1. Tutte queste caratteristiche coincidono pienamente con quelle del gruppo clonale, costituito perlopiù da ceppi DT104, che nell'ultimo decennio ha avuto una larga diffusione in tutto il mondo. Nel loro insieme, questi dati, sia pure nella loro parzialità, indicano che, tra la fine degli anni '90 e i primi anni 2000, in alcuni allevamenti cunicoli lucani era presente una popolazione di ceppi clonalmente correlati tra loro che costituivano il sottoinsieme di un più ampio gruppo pandemico. In quegli anni la diffusione di tale sottogruppo era ancora molto limitata in Italia, ma nel corso di pochi anni avrebbe aumentato la sua prevalenza fino a divenire uno dei pulsotipi più rilevanti come causa di salmonellosi nell'uomo (Dionisi *et al.,* 2009). Inoltre, non è da trascurare il fatto che i ceppi di origine cunicola qui esaminati siano resistenti ad antibiotici poco utilizzati nel coniglio, mentre sono suscettibili ad antibiotici quali la gentamicina e l'enrofloxacina che invece sono tra i pochi ad essere impiegati in coniglicoltura. Questo dato, oltre a rimarcare la stretta correlazione esistente tra i ceppi diffusi negli allevamenti cunicoli e quelli di interesse clinico umano, lascia ipotizzare la possibilità di una trasmissione del patogeno in entrambi i sensi, sia dall'uomo al coniglio sia viceversa. Anche se tale ipotesi necessita il suffragio di ulteriori dati, non è illogico supporre che l'infezione del coniglio potrebbe essere provocata anche da ceppi che abbiano infettato l'uomo e che siano stati trasmessi all'ospite cunicolo per via diretta o indiretta, mediata, in quest'ultimo caso, da vettori o veicoli umani o ambientali. Del resto il quadro complessivo è altamente dinamico, in quanto è frequente l'insorgenza di nuovi cloni, anche se poi non tutti hanno capacità di penetrazione tale da renderli epidemici. È il caso del ceppo DT208, isolato in Puglia nel 2000 e descritto nel presente studio. Esso presenta profili peculiari sia in termini di multiresistenza (STR-SMX-TET), sia di PFGE (STYMXB.0110). Le resistenze antimicrobiche da esso esibite scaturiscono da geni differenti rispetto a quelli dei ceppi DT12 e DT104 esaminati e manca della SGI-1. Tuttavia, anche in questo caso i geni di resistenza sono associati ad elementi genetici, quali integroni e trasposoni, impli-

cati nell'insorgenza e nella diffusione di ceppi multiresistenti, e nell'evoluzione batterica. Essi sono implicati anche nel trasferimento genico orizzontale sia interspecie, sia intraspecie. Pertanto, sono fondamentali misure atte a prevenire questo fenomeno, a cominciare dall'uso prudente degli agenti antimicrobici o all'individuazione di strategie alternative rispetto alla metafilassi antibiotica. Resta comunque l'esigenza di caratterizzare approfonditamente i ceppi responsabili di salmonellosi anche nel coniglio, per individuare in tempi utili l'insorgenza di ceppi potenzialmente più rischiosi per l'uomo e per il coniglio.

Tabella 1 – Dati riepilogativi dei ceppi di S. Typhimurium descritti nel presente lavoro.

Regione/anno di isolamento	Profili di resistenza	Fagotipi	Pulsotipo secondo PulseNet	Pres. della SGI-1	Integr. di classe 1	Cassette geniche	Altri geni di resistenza
Basilicata/1999	AMP-CHL-STR-SMX-TET	DT104	STYMXB.0061	+	+	*aadA2;* bla_{PSE-1}	*sul1; floR; tetA*(G)
Puglia/2000	STR-SMX-TET	DT208	STYMXB.0110	-	+	*aadA1*	*sul1; sul2; tetA*(C)
Basilicata/2003	AMP-CHL-STR-SMX-TET	DT12	STYMXB.0061	+	+	*aadA2;* bla_{PSE-1}	*sul1; floR; tetA*(G)
Basilicata/2003	AMP-CHL-STR-SMX-TET	DT12	STYMXB.0061	+	+	*aadA2;* bla_{PSE-1}	*sul1; floR; tetA*(G)

BIBLIOGRAFIA

CLSI, 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standards. 9th Eds. CLSI. M2-A9.

Dionisi, A.M., Graziani C., *et al.*, 2009. Molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and monophasic variant (*S.* 4,[5],12:i:-) isolated from human infections in Italy. Foodborne Pathog. Dis. 6:711-717.

Gatto, A.J., Peters, T.M., *et al.*, 2006. Distribution of molecular subtypes within *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* phage 4 and *S.* Typhimurium definitive phage type 104 in nine European countries, 2000-2004: results of an international multicentre study. Epidemiol. Infect. 134:729-736.

Ribot, E.F., Fair M.A. *et al.*, 2006. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog. Dis. 3:59-67.

MYXOMATOSI DEL CONIGLIO: IL CONTRIBUTO DEL LABORATORIO DIAGNOSTICO ALLA GESTIONE E CONTROLLO DELLA MALATTIA SUL TERRITORIO

CAPUCCI L.[1], CAVADINI P.[1], BOTTI G.[1], BRIVIO R.[2], GRILLI G.[3], LAVAZZA A.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini"*
Reparto di Proteomica e Centro Nazionale di Referenza per le Malattie Virali dei Lagomorfi, Brescia, Italy.
[2]*Servizio SATA, Regione Lombardia, Italy.*
[3]*Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Milano, Italy*
Lorenzo Capucci, Reparto Proteomica, IZSLER, Via Bianchi 9, 25124 Brescia, Italy
Tel. +39 030 2290671 - Fax: +39 030 2290 559
*Corresponding author: lorenzo.capucci@izsler.it

ABSTRACT

Rabbit Myxomatosis: the role of the diagnostic laboratory for the managing and control of the disease on the field

Myxomatosis still represents one of the main health problems of farmed, wild and rural rabbits. This is also due to the complexity of its aetiological agent; in fact, only recent studies have partially shown the genomic organization and function of the 171 proteins, which the myxomavirus, a member of the Poxviridae family, genus Leporipoxvirus, expresses during the various stages of infection. These data have direct and positive effects on the improvements of diagnostic methods. In particular, molecular biology and genotyping techniques make possible to quickly get diagnostic results and to precisely differentiate vaccine from wild strains.

Key words: Genotyping, Laboratory diagnosis, Myxomatosis, Serology.

INTRODUZIONE

La storia della myxomatosi in Europa data al 1952, quando il virus fu deliberatamente rilasciato in Francia per ridurre l'elevata e dannosa presenza di conigli selvatici. Per lo stesso motivo la malattia era già stata introdotta in Australia nel 1950. L'esperienza acquisita sul campo ha poi mostrato come il continuo rapporto virus-ospite porti alla selezione sul campo di ceppi del virus della myxomatosi meno virulenti e di una popolazione cunicola geneticamente più resistente all'infezione. La conseguenza è l'attuale circolazione sul territorio di ceppi a diverso grado di patogenicità che, in relazione alle caratteristiche della popolazione cunicola (genetica, situazione immunitaria, densità, ecc) e ambientali (stagione, umidità, ecc), si alternano negli anni. Per esempio, proprio quest'anno nel Nord Italia si è registrato un inusuale elevato numero di focolai di mixomatosi (oltre 45 positività accertate) nella popolazione sel-

vatica, rurale e presumibilmente, pur in assenza di denunce, anche negli allevamenti industriali, con elevati tassi di mortalità. Alla base del "problema" myxomatosi, vera e continua minaccia e talora piaga per gli allevamenti del settore, vi sono le caratteristiche del suo agente eziologico; infatti, tra tutti i virus, l'agente della myxomatosi (famiglia *Poxoviriade*, genere *Leporipoxvirus*) è fra i più complessi ed evoluti. Il genoma del virus è a DNA ed è costituito da 171 geni. All'incirca 70 di questi codificano per proteine non essenziali per la replicazione del virus ma fondamentali per la regolazione dei rapporti con l'ospite. Queste proteine sono suddivise, sulla base della funzione nell'ospite, in diverse sottofamiglie che interferiscono con: 1) la risposta immunitaria dell'ospite riducendone l'efficacia; 2) il processo di apoptosi (suicidio della cellula), che s'innesca naturalmente non appena le cellule vengono infettate dai virus al fine di limitarne la replicazione/sopravvivenza; 3) l'attività di macrofagi e linfociti T, cellule fondamentali sia per l'attivazione dell'immunità innata che specifica. La presenza di queste proteine e la loro azione sinergica e modulata, sono causa prima dei meccanismi di patogenesi dell'infezione e del decorso della malattia in termini più o meno gravi. Infatti, la fase finale dell'infezione è spesso caratterizzata da mortalità, legata all'immunosoppressione complessiva e protratta dell'animale, che favorisce l'istaurarsi d'infezioni batteriche, causa ultima di morte. E' quindi facile dedurre che anche la diagnosi della mixomatosi, nel senso avanzato del termine e non della mera diagnosi di malattia, sia un processo complesso. Di seguito si espone sinteticamente quanto è oggi possibile fare in termini di diagnosi di laboratorio quale supporto e aiuto per il controllo e la gestione della malattia in campo.

MATERIALI E METODI

Per i dettagli metodologici essenziali su gli esempi diagnostici riportati si veda la legenda delle figure.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Sierologia della myxomatosi

Il livello serico di anticorpi specifici per il virus della mixomatosi non è indice di protezione dalla malattia come invece lo è, per esempio, nel caso della malattia emorragica virale. Nonostante ciò, l'analisi sierologica mantiene una sua indubbia utilità diagnostica, quantomeno a due livelli: 1) consente di monitorare l'efficacia della profilassi vaccinali, nei meri termini di controllo di un'avvenuta risposta immunitaria specifica; 2) nei casi di allevamenti, vaccinati e non, in cui è subentrato il virus patogeno, in congiunzione con la clinica, può essere d'aiuto nel definire il rapporto infetti/malati e quindi stimare il grado di "patogenicità" del ceppo virale o, nel caso di animali vaccinati, il livello complessivo di protezione acquisito dalla popolazione. Dal punto di vista metodologico le tecniche ELISA, potenziate dall'utilizzo di Anticorpi Monoclonali (AcM), sono quelle più utilizzate. Attualmente la reazione in uso presso il CReMaViLa è una reazione di competizione verso la proteina 71L (protei-

na immunodominate dell'envelope) fra le più immunogene e per la quale si dispone di AcM specifici (Botti *et al.,* 2007). La reazione ha un'elevata specificità e sensibilità e consente in una buona parte dei casi e sulla base dei titoli rilevati, di distinguere gli animali con infezione recente da quelli vaccinati (Lavazza *et al.,* 2004).

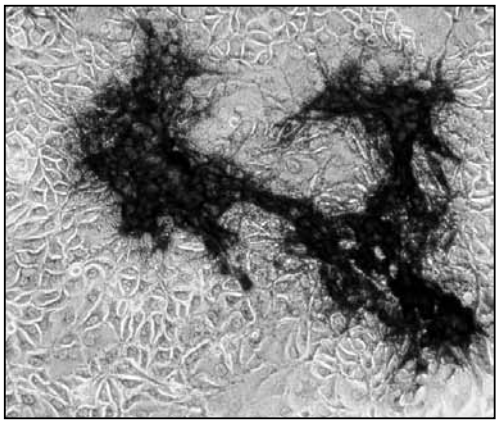

Figura 1 – Virus della mixomatosi evidenziato in immuno-perossidasi.
Isolato da campo amplificato su cellule RK13. Dopo fissazione, le cellule sono incubate prima con un pool di AcM anti-myxomavirus e successivamente con un anti-IgG topo HRP.

Diagnosi classica

La ricerca del virus per la diagnosi eziologica di myxomatosi dispone di vari metodi, tutti di sufficiente sensibilità diagnostica e ciò poiché nelle lesioni classiche (noduli) il virus è presente in concentrazioni elevate. Metodi diretti sono l'immunofluorescenza sul tessuto o impronte congiuntivali, come pure reazioni ELISA entrambe basate anche sull'uso di AcM specifici. L'osservazione al microscopio elettronico in colorazione negativa è pure metodo affidabile grazie alle dimensioni e alla tipica morfologia del virus. L'amplificazione del virus su colture cellulari idonee rimane uno dei metodi più sensibili da utilizzarsi anche per ricerca di virus a concentrazioni ridotte come, per esempio, nei casi di myxomatosi atipica, anche partendo da tamponi oculari. Il metodo è però costoso e "lento" poiché prevede, in relazione alla concentrazione del virus e del ceppo, ripetuti passaggi cellulari che richiedono nel complesso sino a 5-6 giorni di lavoro ed osservazione. La specificità dell'amplificazione del virus su cellule può essere poi confermata con metodi immunologici, il più classico ed immediato dei quali è l'immunoperossidasi. Anche in questo caso l'utilizzo di AcM specifici è assai vantaggioso in termini specificità e sensibilità (Figura 1).

Diagnostica virologica avanzata

Come per gli altri sistemi virali, anche nel caso della myxomatosi l'introduzione delle tecniche di biologia molecolare costituisce un potente strumento sia per la diagnosi ma ancor di più per il successivo studio di caratterizzazione degli isolati. Infatti, l'ampio genoma di DNA del virus, la cui sequenza completa è disponibile in banca dati per i ceppi Lausanna e per il ceppo vaccinale SG33 e in parte per il ceppo vaccinale Borghi, si presta ad amplificazioni *in vitro* dirette sia mediante le classiche PCR che in Real-Time PCR. Nel primo caso il frammento di DNA che si ottiene può essere direttamente sequenziato per conferma diagnostica o studi di caratterizzazione, mentre con la Real-Time, oltre a diminuire i rischi di contaminazione fra campioni in analisi, è possibile quantizzare il numero di genomi presenti nel campione (titolazione virale). In figura 2 è riportato un esempio applicativo. A seguito del sequenziamento del genoma del virus tra i geni M143-M144, sono state identificate più muta-

zioni specifiche del solo genoma dei ceppi vaccinali SG33 e Borghi. Di conseguenza è stato possibile sviluppare una PCR diagnostica in grado di differenziare i ceppi di virus di campo dai ceppi vaccinali. I risultati sono stati ottenuti con la coppia di primers: A) specifici per il gene M071 amplificabile in tutti i ceppi; B) specifici per il ceppo vaccinale SG33; C) specifici per il ceppo vaccinale Borghi.

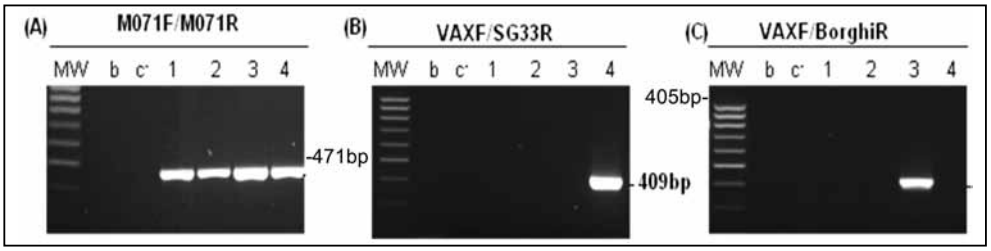

Figura 2 – Uso della PCR nella diagnosi differenziale della myxomatosi (Linee 1-4: prodotti ottenuti dall'amplificazione di DNA estratto da: 1) un ceppo del campo, 2) ceppo di riferimento Moses, 3) ceppo vaccinale Borghi, 4) ceppo vaccinale SG33. MW. Markers, b: bianco, c: controllo negativo. Con la PCR: (A) si amplifica un frammento di 471bp in tutti i campioni analizzati (PCR diagnostica per la presenza del virus); (B) si amplifica un frammento di 409bp per il solo ceppo vaccinale SG33; (C) si amplifica un frammento di 405bp per il solo ceppo vaccinale Borghi).

BIBLIOGRAFIA

Botti, G., Lavazza, A., Cristoni, S., Brocchi, E., Capucci, L., 2007. Sviluppo e standardizzazione di un test ELISA per la sierologia della mixomatosi. In: Atti Giornate di Coniglicoltura ASIC 2007, Forlì, Italy, p. 139.

Cavadini, P., Botti, G., Barbieri, I., Lavazza, A., Capucci, L., 2010. Molecular characterization of SG33 and Borghi vaccines used against myxomatosis. Vaccine 28:5414-5420.

Lavazza, A., Graziani, M., Tranquillo, V.M., Botti, G., Palotta, C., Cerioli, M., Capucci, L., 2004. Serological evaluation of the immunity induced in commercial rabbits by vaccination for Myxomatosis and RHD. In: Proc. 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico, pp. 569-575.

Stanford, M.M., Werden, S.J., McFadden, G., 2007. Myxoma virus in the European rabbit: interaction between the virus and its susceptible host. Vet. Res. 38:299-318.

ISOLAMENTO DI *ARCANOBACTERIUM PYOGENES* IN UN EPISODIO DI INFERTILITÀ DELLA CONIGLIA

COCCHI M.[1], CEGLIE L.[1], DI GIUSTO T.[1], DEOTTO S.[1], CLAPIZ L.[1], GENERO N.[1], BREGOLI M.[1], LENARDUZZI M.[2]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione territoriale di Udine, Italy*
[2]*Cooperativa Produttori Conigli, Pordenone, Italy*
Monia Cocchi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via della Roggia, 100, 33030 Basaldella di Campoformido (UD), Italy - Tel. +39 0432 561529 - Fax: +39 0432 562676
*Corresponding author: mcocchi@izsvenezie.it

ABSTRACT

***Arcanobacterium pyogenes* as a cause of reproductive disorders in a rabbit breeding**

Reproductive pathology is conditioned by several factors, which can influence reproductive rhythm in a farm. In rabbits, infertility can be associated with non-infectious and infectious causes. Several pathogens can lead to infertility; among them *Pasteurella multocida* and *Staphylococcus aureus* are the most important. In certain circumstances, *Arcanobacterium pyogenes*, a commensal of mucous membranes, becomes an opportunistic pathogen. In different animal species it can cause suppurative infections involving skin, joints and organs belonging to reproductive and respiratory systems. In this paper we report the isolation of five *A. pyogenes* strains recovered from does with infertility problems. They were isolated from three uteri and two vaginal swabs. Necropsy revealed lesions only in three animals. Results seem to indicate that *A. pyogenes* can cause severe lesions in does, in association with improper management conditions in artificial insemination.

Key words: Arcanobacterium pyogenes, Infertility, Doe.

INTRODUZIONE

La patologia riproduttiva è una patologia condizionata e multifattoriale. Diversi sono i fattori che possono influenzare le *performances* riproduttive nell'allevamento cunicolo: qualità e quantità del seme, lo stato fisiologico e sanitario della femmina, oltre a fattori quali un errato microclima (alta temperatura), una inadeguata alimentazione (soprattutto diete con un basso tenore proteico e/o basso contenuto di vitamine A e K) o "eventi stressanti", in generale. Fra gli agenti eziologici più importanti sono compresi batteri come *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, e *Chlamydophyla abortus* e i virus agenti di malattia emorragica virale e myxomatosi. Accanto a questi, sono riportati in bibliografia casi sporadici di metrite causate da *Moraxella spp*.

Arcanobacterium (A.) pyogenes, solitamente commensale delle mucose di varie specie animali, è considerato un patogeno opportunista, responsabile di lesioni piogeniche a carico di cute, articolazioni e organi dell'apparato respiratorio e riproduttivo (Timoney *et al*., 1988, citato da Jost *et al*., 2005). Scopo del presente lavoro è descrivere l'isolamento e l'identificazione di ceppi di *A. pyogenes* isolati in coniglie affette da infertilità.

MATERIALI E METODI

Descrizione allevamento

L'allevamento consta di 500 fattrici in produzione, gestite con una ciclizzazione a banda unica. E' costituito da due locali distinti, uno dedicato al reparto maternità ed uno all'ingrasso. Il primo presenta 420 fori nido a piano unico con alimentazione automatica e 320 posti rimonta su gabbie a tre piani parzialmente sovrapposte. La produzione è caratterizzata da una ciclicità di 49 giorni, con inseminazione artificiale a 18 giorni post parto. Mediamente vengono eseguite 500 inseminazioni/ciclo; di queste il 16% è effettuato su fattrici nullipare. La fertilità in generale è superiore all'80%, quella delle nullipare supera l'86%. Il numero medio di nati vivi/parto è rispettivamente di 9,3; quello dei nati morti/parto è pari a 0,6. La perdita delle fattrici nel corso del ciclo produttivo è di circa il 4%. Da fine agosto 2010 si è assistito ad una riduzione della fertilità di circa il 5%, imputabile ad un calo di condizione delle fattrici in seguito al periodo estivo, e ad una costante diminuzione del numero di nati. All'inizio di ottobre, il 35% delle fattrici ha prodotto meno di 6 conigli per parto, mentre il numero dei nati morti è aumentato di circa il 2%. Al fine di stabilire l'eziologia della sindrome, nove fattrici sono state conferite presso la sezione di Udine dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, dove sono state sottoposte ad esame anatomo-patologico e a successive indagini laboratoristiche.

Analisi batteriologiche

Per ogni soggetto sono stati eseguiti prelievi da utero, fegato, pericardio, polmone, midollo allungato, milza e cieco. Dai primi quattro organi è stato condotto un esame batteriologico sia inoculando una piastra di agar sangue (AS) e una di eosin-methylen blue (EMB) (esame batteriologico diretto) sia inoculando una brodocoltura di Triptose Soy Broth (TSB) (esame batteriologico indiretto). Tutti i terreni sono stati forniti dal Centro Servizi alla Produzione (CSP, Legnaro, IZSVe). Le piastre di AS sono state incubate per 24-96 h in aerobiosi e in atmosfera modificata (arricchita con CO_2, Campygen, Oxoid), il terreno EMB e le brodocolture per 24-48 ore in aerobiosi. Le brodocolture sono state seminate su AS in caso di crescita negativa all'esame batteriologico diretto. Le letture sono state eseguite ogni 24 h sino al 4° giorno d'incubazione. Dal midollo allungato è stata effettuata la ricerca di *Listeria monocytogenes*, mentre dal pool di fegato, milza e cieco la ricerca di *Salmonella spp*. e *Campylobacter* termofili. Inoltre, in 6 soggetti è stato effettuato un tampone vaginale, sottoposto all'indagine batteriologica come sopra descritto. In base alla morfologia della colonia batterica, la colorazione di Gram, test di catalasi ed ossidasi, i ceppi batterici sono stati identificati tramite kit biochimici miniaturizzati (APY CORYNE e APY STAPH, Biomerieux).

Indagine genotipica

Da ogni soggetto sono stati eseguiti tamponi vaginali per ricerca *Chlamydophyla abortus.* Il DNA è stato estratto con il kit commerciale High Pure PCR Template Isolation (Roche). I campioni sono stati testati mediante un protocollo di Real Time PCR di screening per *Chlamydiaceae* e, successivamente, sono stati esaminati mediante un protocollo di Real Time PCR per discriminare tra le seguenti specie: *Cp. pecorum, Cp. psittaci, Cp. abortus* e *C. suis,* secondo quanto descritto da Pantchev *et al*. (2009).

RISULTATI E CONCLUSIONI

I risultati dell'esame anatomo-patologico e dell'esame batteriologico (diretto e indiretto) condotto su utero e sui tamponi vaginali sono riassunti in tabella 1. Gli esami batteriologici (diretto e indiretto) condotti su fegato, pericardio e polmone, nonché la ricerca di *Chlamydophyla abortus*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* termofili risultavano negativi. *A. pyogenes* è stato isolato in 5 soggetti, sia da esame batteriologico diretto che indiretto, in due soggetti da tampone vaginale ed in tre soggetti da utero. Le colonie di dimensioni pari a 1-2 mm, emolitiche con margini netti sono apparse dopo 72-96 ore incubazione da AS (in atmosfera modificata).

Tabella 1 – Risultato dell'esame batteriologico eseguito da tampone vaginale e da utero (n.e.= non eseguito).

Soggetto	Sito prelievo	Esame batteriologico diretto	Esame batteriologico indiretto	Lesione anatomopatologica
1	Tampone vaginale	n.e.	n.e.	Endometrite purulenta e peritonite ascessuale
	Utero	*A. pyogenes*	*A. pyogenes*	
2	Tampone vaginale	n.e.	n.e.	Assenza di lesioni anatomo patologicamente rilevabili
	Utero	*A. pyogenes*	*A. pyogenes*	
3	Tampone vaginale	n.e.	n.e.	Assenza di lesioni anatomo patologicamente rilevabili
	Utero	*A. pyogenes*	*A. pyogenes*	
4	Tampone vaginale	n.e.	n.e.	Gravidanza extrauterina
	Utero	Negativo	Negativo	
5	Tampone vaginale	n.e.	n.e.	Ascesso tubarico e peritonite purulenta
	Utero	Negativo	*Staphylococcus coagulasi negativo*	
6	Tampone vaginale	Negativo	Negativo	Gravidanza extrauterina, Ascesso tubarico e peritonite siero fibrinosa
	Utero	Negativo	Negativo	
7	Tampone vaginale	Negativo	Negativo	Endometrite catarrale
	Utero	Negativo	Negativo	
8	Tampone vaginale	*A. pyogenes*	*A. pyogenes*	Endometrite catarrale
	Utero	Negativo	Negativo	
9	Tampone vaginale	*A. pyogenes*	*A. pyogenes*	Endometrite catarrale
	Utero	Negativo	Negativo	

In due soggetti non si sono osservate lesioni macroscopicamente rilevabili, mentre in tre soggetti *A. pyogenes* è stato isolato da endometrite (catarrale e purulenta). Inoltre, nel soggetto 1, il microrganismo è stato identificato anche dalla lesione ascessuale a carico del peritoneo, insieme a *Staphylococcus aureus*. *A. pyogenes* è un batterio commensale, patogeno opportunista. Esso possiede un elevato numero di fattori di virulenza che contribuiscono a definire il suo potenziale patogeno. Essendo un commensale, la fonte di infezione di *A. pyogenes* è spesso autogena, conseguente a microtraumi delle mucose, favorenti la disseminazione del microrganismo (Jost *et al*., 2005). Nel presente lavoro, successivamente all'identificazione di *A. pyogenes*, sono stati apportati cambiamenti nella gestione dell'inseminazione, cambiando tipologia di pipetta (lunghezza minore) e applicando misure atte sia a contenere i fattori stressanti per la fattrice sia a migliorare le condizioni igienico-sanitarie. Queste modifiche hanno determinato un ritorno alle performances precedenti il periodo considerato. Le fattrici rappresentano un importante settore nell'allevamento cunicolo; una riduzione dei parametri di fertilità, fecondità e prolificità ha un notevole impatto economico su tutto l'allevamento. I fattori che influenzano le differenti forme di ipo-infertilità sono molteplici. Fra questi, una non corretta gestione dell'inseminazione artificiale (tipologia strumenti, igiene, manipolazione della femmina) può favorire l'impianto e la successiva moltiplicazione di patogeni opportunisti, come *A. pyogenes*.

BIBLIOGRAFIA

Jost, B.H., Billington, S.J., 2005. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. Antonie van Leeuwenoek 88:87-102.

Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., Sachse, K., 2010. Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia spp*. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 33:473-484.

PRESENZA DEI GENI *ICAA* E *ICAD* E FORMAZIONE DEL BIOFILM IN CEPPI DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATI NEL CONIGLIO

COCCHI M., DI GIUSTO T., DEOTTO S., BACCHIN C., CLAPIZ L.,
GENERO N., DI SOPRA G., BREGOLI M., PASSERA A., DRIGO I.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione territoriale di Udine, Italy
Monia Cocchi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via della Roggia, 100,
33030 Basaldella di Campoformido (UD), Italy - Tel. +39 0432 561529 - Fax: +39 0432 562676
*Corresponding author: mcocchi@izsvenezie.it

ABSTRACT

Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in ***Staphylococcus aureus*** strains isolated from rabbit. In commercial rabbitries, pathologies due to *Staphylococcus aureus* are considered one of the most important causes of economic losses. The pathogenesis of the *Staphylococcus aureus* infection is related to various factors which promote the adhesion and the colonization to the host surfaces (toxins, extracellular factors and polysaccharidic biofilm). Moreover, the biofilm formation represents a key factor for protection against phagocytosis and antimicrobial agents. It is considered responsible for chronic infections, too. One hundred and four *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbits affected by mastitis were evaluated for slime production by Congo Red agar test (CRA) and by a specific PCR based procedure. Results indicate that 6/104 (6%) strains showed the phenotypic trait, whereas 104/104 (100%) were positive to molecular characterization.

Key words: Staphylococcus aureus, IcaA gene, IcaD gene, Biofilm formation.

INTRODUZIONE

Nell'allevamento cunicolo *Staphylococcus aureus* rappresenta, insieme a *Pasteurella multocida*, uno dei più frequenti agenti di infezione piogena a carico di diversi distretti (cute, annessi cutanei, apparato respiratorio e genitale). La patogenesi dell'infezione è legata all'effetto combinato di diversi fattori di virulenza; fra di essi si annoverano tossine, fattori extracellulari e la capacità del microrganismo di formare il biofilm. La produzione del biofilm, definito come "*una comunità strutturata di cellule batteriche racchiuse in una matrice polimerica autoproducentesi ed aderente ad una superficie inerte o no*" (Costerton *et al*., 1999) è associata sia ad una maggiore capacità di *Staphylococcus aureus* di aderire e colonizzare i tessuti dell'ospite che ad una maggiore capacità di eludere le difese immunitarie. La formazione del biofilm è inoltre implicata nei meccanismi di cronicizzazione dell'infezione e nell'aumentata resistenza del microrganismo agli antimicrobici (Melchior *et al*., 2006). Essa vie-

ne regolata a livello genetico dall'*intracellular adhesion* (*ica*) *locus*, che controlla la sintesi di un'adesina, PIA (polysaccharide intercellular adhesin), molecola di natura polisaccaridica che permette l'adesione intercellulare. L'*ica locus* è costituito dai geni *icaADBC* che codificano proteine medianti la sintesi di PIA nei ceppi di *Staphylococcus aureus*. Fra di essi, *icaA* e *icaD* giocano un ruolo fondamentale nella formazione del biofilm. In particolare, il gene *icaA* codifica per l'enzima N-acetilglucosaminiltransferasi, implicato nel processo di formazione del biofilm. La completa espressione fenotipica del tratto genetico è determinata dall'espressione contemporanea sia dell'*icaA* che dell'*icaD* (Arciola *et al*., 2002).
Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la presenza dei geni *icaA* e *icaD* in ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati da coniglie affette da mastite, valutando inoltre fenotipicamente la formazione del biofilm.

MATERIALI E METODI

104 ceppi di *S. aureus*, isolati in corso di mastite, sono stati sottoposti alle seguenti indagini fenotipiche e genotipiche.

Analisi fenotipica

Le colonie di *Staphylococcus aureus* sono state inoculate su Congo Red Agar (CRA), allestito secondo quanto descritto da Arciola *et al*. (2002). Le piastre sono state incubate per 48 ore a 37± 2°C, in condizioni di aerobiosi e successivamente poste per ulteriori 24-48 ore a temperatura ambiente. La valutazione delle colonie è stata basata su un'evidenza colorimetrica: le colonie producenti il biofilm apparivano nere/nero-grigie/grigie su fondo rosso, mentre le colonie non producenti il biofilm apparivano rosa/rosso su fondo scuro. *S. epidermidis* ATCC 35984 e *S. epidermidis* ATCC 12228 sono stati utilizzati quali controllo positivo e negativo di reazione, rispettivamente.

Analisi genotipica

Il DNA è stato estratto utilizzando il kit commerciale "GeneElute Bacterial genomic DNA kit" (Sigma-Aldrich). La ricerca geni *icaA* e *icaD* è stata eseguita secondo quanto descritto da Tristan *et al.* (2003).

RISULTATI E CONCLUSIONI

L'indagine fenotipica ha evidenziato 6/104 (6%) ceppi producenti il biofilm (biofilm +), mentre 98/104 (94%) non producenti il biofilm (biofilm -). Genotipicamente, invece, 104/104 (100%) ceppi di *Staphylococcus aureus* erano positivi alla ricerca per i geni *icaA* e *icaD*.
L'analisi fenotipica condotta evidenzia una elevata prevalenza di ceppi biofilm -, diversamente l'analisi genotipica sottolinea un'ampia diffusione dei geni responsabili della formazione del biofilm. Uno studio condotto su ceppi di *Staphylococcus*

aureus isolati in corso di mastite bovina ha evidenziato una prevalenza dei geni codificanti il biofilm pari al 100%, e una percentuale pari al 70% di ceppi positivi al CRA test. (Vasudevan *et al*., 2003). Arciola *et al*. (2002), inoltre, descrivono ceppi fenotipicamente "biofilm negativi, genotipicamente positivi", in cui la mancata espressione genica è associata ad una mutazione puntiforme o a fattori interferenti l'espressione genica stessa. L'espressione del *locus* genico è infatti, altamente variabile, influenzato ad esempio da riarrangiamenti genomici. Baselga *et al.* (1993) hanno dimostrato come l'espressione fenotipica del biofilm risenta delle condizioni di coltivazione del microrganismo, come ad esempio l'atmosfera di incubazione. Nel presente lavoro, l'incubazione di alcuni ceppi sia in aerobiosi che in anaerobiosi (dati non pubblicati) non ha evidenziato differenze significative di crescita e di espressione fenotipica sia nei ceppi biofilm + che in quelli biofilm -. Nel presente lavoro, inoltre, l'adozione della scala cromatica per la lettura delle piastre e il prolungamento dell'incubazione a 96 ore hanno permesso, nel primo caso, di ridurre la possibile variabilità legata all'interpretazione dell'operatore, mentre nel secondo caso, ha permesso di apprezzare in modo più corretto il colore delle colonie. Infatti, la lettura effettuata a 48 ore permetteva di apprezzare in modo esaustivo il colore delle colonie solo nei ceppi positivi; nel caso dei ceppi negativi, invece, la lettura a 48 ore permetteva una corretta interpretazione solo nel 70% (ca) dei ceppi. Nei ceppi sottoposti ad esame, inoltre, non è stata registrata la formazione di *spikes* di colore rosa/rosso all'interno di colonie nere (positive), variazione descritta in ceppi isolati in corso di infezione nell'uomo (Arciola *et al*., 2002). Dal confronto del profilo di antibiotico resistenza dei ceppi genotipicamente e fenotipicamente positivi e dei ceppi genotipicamente positivi ma fenotipicamente negativi non emerge una significativa differenza nel profilo di antibiotico resistenza (dati non pubblicati). Diversamente, vari autori sottolineano una ridotta sensibilità agli antimicrobici in ceppi di *Staphylococcus aureus* biofilm +, isolati da mastite bovina (Vasudevan *et al.,* 2003).

Staphylococcus aureus nell'allevamento del coniglio costituisce un'importante problema, poiché rappresenta una delle cause principali di riforma delle fattrici. Secondo gli autori, questo costituisce il primo studio sulla presenza genotipica e fenotipica del fattore biofilm condotto su ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati da coniglio. Considerando l'elevata distribuzione dei geni nei ceppi di *Staphylococcus aureus*, ulteriori indagini sono necessarie per stabilire l'esatto ruolo del biofilm quale fattore di virulenza in tali ceppi. Si sottolinea la necessità di associare l'analisi fenotipica a quella genotipica nello studio del biofilm.

BIBLIOGRAFIA

Arciola, C.R., Capoccia, D., Gamberoni, S., Cervellati, M., Donati, E., Montanari, L., 2002. Detection of slime production by means of an optimised Congo Red Agar plates based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolate genotyped for *ica locus*. Biomaterials 23:4233-4239.

Baselga, R., Albizu I., De La Cruz, M., Del Cacho, E., Barberan, M., Amorena, B.,

1993. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implication in colonization and virulence. Infect. Immun. 61:4857-4862.

Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284:1318-1322.

Melchior, M.B., Gremmels, J.F., Gaastra, W., 2006. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. J. Vet. Med. B. 53:326-332.

Tristan, A., Ying, L., Bes, M., Etienne, J., Vandenesch, F., Lina, G., 2003. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. J. Clin. Microbiol. 41:4465-4467.

Vasudevan, P., Nair, MM., Annamalai, T., Venkitanara, KS., 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Vet Microbiol. 92:179-185.

STUDIO DELLA VANCOMICINO RESISTENZA IN CEPPI DI *ENTEROCOCCUS SPP* ISOLATI DAL CONIGLIO. RISULTATI PRELIMINARI

COCCHI M., GENERO N., CLAPIZ L., DEOTTO S., DI SOPRA G., BREGOLI M., DI GIUSTO T.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione territoriale di Udine, Italy
Monia Cocchi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Via della Roggia, 100, 33030 Basaldella di Campoformido (UD), Italy - Tel. +39 0432 561529 - Fax: +39 0432 562676
*Corresponding author: mcocchi@izsvenezie.it

ABSTRACT

Vancomycin resistance in *Enterococcus spp*. strains isolated from rabbits. Preliminary results

Enterococcus spp. are part of normal intestinal flora both in humans and animals. Some strains, multidrug-resistant, can cause serious hospital- and community-acquired infections. One of the most important resistance is the vancomycin resistance. Vancomycin, a glycopeptide antibiotic, represents the last effective drug used to treat such infections in humans. Numerous studies have identified treatment with some glycopeptides as risk factors for acquiring vancomycin resistance both in humans and in animals. Nevertheless some vancomycin resistance strains are able to transfer the codifying resistance genes to other bacterial species. Due to the implications in public health, monitoring of antimicrobial resistance is of the utmost importance to preserve public health. In this study, we investigated the presence of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) in 139 strains isolated from rabbit faecal samples. Bacterial strains were submitted to examination, using two different media (Slanetz Bartley and Slanetz Bartley with 6 mg/l of vancomycin). Vancomycin resistant strains were not found.

Key words: Enterococcus spp., Vancomycin resistance, Rabbit.

INTRODUZIONE

Gli Enterococchi sono batteri Gram positivi, ubiquitari, normalmente presenti nell'ambiente e nel tratto gastroenterico di uomini ed animali. Essi sono caratterizzati dalla presenza di sequenze geniche codificanti la resistenza a differenti classi di antibiotici (beta-lattamici, aminoglicosidi e glicopeptidi) e dalla possibilità di trasferire questi geni ad altre specie batteriche commensali. Negli Enterococchi la resistenza agli antimicrobici può essere intrinseca (manifestandosi a basse concentrazioni di principio attivo) o acquisita. Nell'ambito dell'antibiotico resistenza particolare importanza rivestono i ceppi di Enterococchi vancomicina resistenti (VRE).

La vancomicina è un antibiotico di natura glicopeptidica che agisce inibendo la formazione della parete batterica ed interferendo con la polimerizzazione del peptidoglicano. Recentemente sono stati individuati come patogeni emergenti responsabili, nell'uomo, di gravi infezioni soprattutto in ambito ospedaliero (Mundy *et al*., 2000), sia in Europa che negli Stati Uniti (Leclerq *et al*., 1988). Da un punto di vista epidemiologico la diffusione dei ceppi è stata inizialmente collegata all'ambiente ospedaliero negli Stati Uniti, a causa di un uso improprio nei protocolli terapeutici della vancomicina. In Europa, invece, l'insorgenza di VRE è stata provocata soprattutto dall'uso di avoparcina, un glicopeptide strutturalmente analogo alla vancomicina, utilizzato come auxinico negli alimenti per animali da reddito, sino al 1997, anno in cui nell'UE è stato definitivamente bandito. La resistenza ai glicopeptidi è determinata dalla presenza di sei distinti *loci* genetici, denominati *Van A,B,C,D,E,G*, codificanti per i rispettivi pattern fenotipici. La capacità, invece, di trasferire geni è legata alla presenza, nel genoma batterico, di plasmidi e trasposoni. Geneticamente, la resistenza è determinata dalla sostituzione della sequenza terminale D-Ala-D-Ala del peptidoglicano con il dipeptide D-Ala-D-Lac nei fenotipi VanA, VanB e VanD, con D-Ala-D-Ser nei fenotipi VanC, VanE, Van G. I fenotipi Van A e Van B sono i più frequenti (Murray, 1998).
Scopo del presente studio è stato quello di studiare la presenza di VRE in campioni di feci di conigli, provenienti da allevamenti del Friuli Venezia Giulia.

MATERIALI E METODI

Nel periodo maggio 2010 - gennaio 2011, 139 campioni di feci di coniglio, provenienti da 15 allevamenti del Friuli Venezia Giulia, sono stati sottoposti alla ricerca di VRE. Le feci sono state inoculate in un brodo di pre-arricchimento, Triptose Soy Broth (TSB, fornito dal Centro Servizi alla Produzione, CSP, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie) in rapporto 1:10 (feci:terreno) ed incubati a 41,5 ± 1°C per 18-24 ore. Al termine dell'incubazione, 10 µl di brodocoltura sono stati trasferiti sul terreno Slanetz Bartley (SB, fornito dal CSP) e Slanetz Bartley addizionato con Vancomicina 6 mg/l (SB + VAN, fornito dal CSP), distribuiti sull'intera superficie servendosi di un'ansa ad L, sterile, monouso. Le piastre sono state incubate a 37 ± 1°C per 18-24 ore, mentre la brodocoltura è stata re-incubata a 41,5 ± 1°C per altre 18-24 ore. Al termine del periodo di incubazione si è proceduto a lettura delle piastre: i ceppi VRE crescono su entrambi i terreni sotto forma di colonie rosa-rosse, mentre i ceppi non vancomicina resistenti crescono solamente su SB, formando colonie rosa-rosso. Nel caso in cui, sulle piastre di SB e SB + VAN, non fosse stata riscontrata alcuna crescita batterica con morfologia attribuibile agli Enterococchi, si è proceduto ad una ulteriore semina del TSB sia su SB che su SB + VAN, incubando a 37 ± 1°C per 18-24 ore (Del Grosso *et al.,* 2000). Quale controllo positivo di processo sia il terreno SB che il terreno SB+VAN sono stati inoculati con il ceppo di *E. faecalis* ATCC 51299.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Da tutti i campioni sottoposti ad indagine sono stati isolati ceppi di *Enterococcus spp*.; tutti i ceppi isolati sono risultati essere vancomicina sensibili (100%). Il ruolo degli animali quali reservoir di VRE è controverso ed ancora oggi oggetto di discussione. Studi condotti in Italia sul suino e sul pollo hanno evidenziato un'alta diffusione di ceppi VRE (Del Grosso *et al*., 2000; Figarolli *et al*., 2006), mentre studi condotti negli Stati Uniti da Hershberg *et al*. (2005) non hanno evidenziato ceppi VRE in diverse specie animali (bovino, suino, tacchino). In Europa, la selezione dei ceppi vancomicina resistenti è stata favorita dall'utilizzo ad esempio dell'avoparcina, glicopeptide simile alla vancomicina. In seguito al divieto di utilizzo in UE di sostanze promotrici della crescita, la colonizzazione da parte di ceppi VRE in alcune specie ad interesse zootecnico è diminuita in maniera significativa (Van den Bogaard *et al*., 2000). Studi condotti sull'uomo hanno identificato nel trattamento con vancomicina, amikacina o cefalosporine ad ampio spettro un fattore di rischio nell'acquisizione della resistenza alla vancomicina negli enterococchi (Altoparlak *et al.,* 2011). Nel caso dei ceppi VRE, inoltre, la possibilità di trasferire i geni codificanti l'antibiotico resistenza ad altre specie batteriche (Biavasco *et al*., 1996) e dall'animale all'uomo lungo la filiera produttiva costituisce un importante elemento di indagine per preservare la salute pubblica. Ad esempio, la descrizione di ceppi di *Staphylococcus aureus* vancomicina intermedi e resistenti (VISA, VRSA) indica l'acquisizione della resistenza al glicopeptide da parte dei ceppi di *S. aureus,* dovuta alla condivisione della medesima nicchia ecologica con ceppi VRE (Noble *et al*., 1992). Da un punto di vista terapeutico, la vancomicina costituisce uno degli antibiotici di elezione nel trattamento delle infezioni stafilococciche umane. Considerando il possibile effetto che la resistenza agli antimicrobici ha sulla salute umana e il suo impatto economico, si rendono necessarie misure di controllo per prevenire il diffondersi di patogeni resistenti dall'animale all'ambiente e all'uomo. Secondo la Direttiva Europea 2003/99 "sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici", recepita dal D.lvo 191/2006, all'articolo 7, si indica infatti agli Stati membri di provvedere alla sorveglianza della resistenza agli antimicrobici, fornendo dati relativi all'incidenza di casi di resistenza agli antimicrobici non solo negli agenti zoonotici ma anche in altri agenti, nella misura in cui questi ultimi possano costituire una minaccia per la sanità pubblica.

BIBLIOGRAFIA

Altoparlak, U., Koca, O., Ozkurt, Z., Akcay, M.N., 2011. Incidence and risk factors of vancomicin resistant enterococcus colonization in burn unit patients. Burns 37:49-53.

Biavasco, F., Giovannelli, E., Miele, A., Vignaioli, C., Facinelli, B., Varaldo P.E., 1996. In vitro conjugative transfer of Van A vancomycin resistance between enterococcus and listeriae of different species. Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis. 15:50-59.

Del Grosso, M., Caprioli, A., Chinzari, P., Fontana, M.C., Pezzetti, G., Manfrin, A., Di Giannatale, E., Goffredo, E., Pantosti, A., 2000. Detection and characterization of vancomycin resistant enterococci in farm animals and raw meat products in Italy. Microb. Drug Resis. 6:313-318.

Figarolli, B.M., Ossiprandi M.C., 2006. Ceppi antibiotico-resistenti di Enterococcus. Ann. Fac. Medic. Vet di Parma, Vol. XXVI, pp. 219-234.

Hershberg, E., Oprea, F.S., Donabedian S. M., Perry, M., Bozigar, P., Bartlett, P., Zervos, M.J., 2005. Epidemiology of antimicrobial resistance in Enterococci of animal origin. J. Antimicrobial Chemoterapy 55:127-130.

Leclerq, R., Derlot, E., Duval, J., Curvalin, P., 1988. Plasmid mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N. Engl. J. Med. 319:157-161.

Mundy, L.M., Sahm, D.F., Gilmore, M., 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev. 13:513-522.

Murray, B.E., 1998. Diversity among multidrug resistant enterococci. Synopses, Emerg. Infect. Dis. 4:37-47.

Noble, W.C., Virani, Z., Cree, R.G.A., 1992. Co-tranfer of vancomycin and other resistance genes from *E. faecalis* NCTC 12201 to *S. aureus*. FEMS Microbiol. Lett. 93:195-198.

Van den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E., 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. Int. J. Antimicrob. Agents 14:327-335.

ENTEROTOSSINE STAFILOCOCCICHE IN CEPPI DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATI IN CORSO DI MASTITE NELLA CONIGLIA

COCCHI M., PASSERA A., DEOTTO S., CLAPIZ L., GENERO N., BREGOLI M., DI GIUSTO T.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione territoriale di Udine, Italy
Monia Cocchi, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via della Roggia, 100, 33030 Basaldella di Campoformido (UD), Italy - Tel. +39 0432 561529 - Fax: +39 0432 562676
*Corresponding author: mcocchi@izsvenezie.it

ABSTRACT

Detection of staphylococcal enterotoxins in *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbits mastitis

Staphylococcus aureus is a common cause of infections both in humans and in animals. It can cause various diseases, producing toxins and other extracellular factors. Staphylococcal enterotoxins are the leading cause of gastroenteritis in humans and moreover they are powerful superantigens able to stimulate non-specific T-cell proliferation. This can give several allergic and autoimmune diseases. The aim of this study was to evaluate the presence of Staphylococcal enterotoxins in 98 rabbit mastitis samples. *Staphylococcus aureus* tested strains did not harbour enterotoxins.

Key words: Staphylococcus aureus, Enterotoxins, Rabbit.

INTRODUZIONE

Staphylococcus aureus è un batterio Gram positivo, normalmente presente sulla cute e sulle mucose dell'uomo e degli animali. In presenza di fattori predisponenti può causare infezioni di diversa gravità a carico di vari organi. La patogenicità di *Staphylococcus aureus* è dovuta alla capacità di produrre una vasta gamma di fattori extracellulari e di tossine. Tra di esse si annoverano le enterotossine stafilococciche (SE), nove proteine basiche (da SEA a SEE e da SEG a SEJ), stabili al calore, resistenti alle proteasi come la pepsina e la tripsina. Negli episodi tossinfettivi esse sono responsabili delle manifestazioni cliniche caratterizzate da nausea, vomito, e grave risentimento organico generale. Diversi studi hanno evidenziato come esse abbiano nell'organismo un differente comportamento; la SEB ad esempio passa più rapidamente della SEA nel circolo ematico, mentre la SEC è la più ospite-specifica e dotata di maggiore cross-reattività (Bergdoll *et al*., 1967; Casman *et al.,* 1967). Le tossine SEA e SED sono quelle maggiormente coinvolte e danno sintomatologia a dosaggi estremamente bassi (per la tossina SEA, ad esempio, detto valore è pari a 100 nanogrammi) (Balaban *et al.*, 2000). Le enterotossine stafilococciche possono inoltre fungere da super-antigeni, grazie alla loro capacità di legare direttamente il com-

plesso maggiore d'istocompatibilità di classe II (MHC II) delle cellule presentanti l'antigene alla porzione variabile del recettore dei linfociti T. Questo processo causa una proliferazione policlonale ed aspecifica delle cellule T, con conseguente rilascio di interleuchine e l'instaurarsi di un processo infiammatorio a carico del tratto gastrointestinale, reso evidente dalle estese e gravi lesioni a carico dello stomaco e dell'intestino tenue (Balaban *et al.*, 2000; Wynn *et al.*, 2006). Scopo del presente lavoro è stato ricercare le enterotossine A, B, C, D in ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati nel coniglio.

MATERIALI E METODI

Novantotto ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati da mastite in conigli provenienti da dieci differenti allevamenti siti in Friuli Venezia Giulia sono stati sottoposti al protocollo di seguito descritto per la ricerca delle enterotossine stafilococciche A, B, C, D. I ceppi di *Staphylococcus aureus* sono stati isolati a partire da agar sangue (AS, fornito dal Centro Servizi alla Produzione, CSP-IZSVe, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie) incubato in aerobiosi per 24-48 ore a 37 ± 2°C. I ceppi batterici con una morfologia riconducibile a *Staphylococcus spp.* sono stati testati sul terreno Mannitol Salt Agar (MSA, Lab M Limited) e sottoposti al test della coagulasi, effettuato con plasma di coniglio. La crescita in MSA e la reazione positiva alla coagulasi permetteva di identificare il ceppo come *Staphylococcus aureus*. Successivamente, i ceppi di *Staphylococcus aureus* sono stati seminati in Tryptone Soya Broth (TSB, CSP-IZSVe) ed incubati a 37°C ± 2°C per 18-24 ore. La brodocoltura è stata centrifugata a 900 g (Sigma 3K10, 3000 rpm, Germany) a 4°C per 20 minuti. Il surnatante ottenuto è stato sottoposto al test di agglutinazione passiva inversa utilizzando il kit Toxin Detection (SET RPLA, OXOID) per la ricerca delle enterotossine stafilococciche A, B, C, D. I ceppi batterici sono stati testati in piastra microtitre utilizzando un test realizzato usando particelle di lattice sensibilizzate con antitossina, che sono in grado di agglutinare in presenza di tossine, fornendo risultati dopo 20-24 ore di incubazione a temperatura ambiente.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Tutti i ceppi di *Staphylococcus aureus* sottoposti ad indagine sono risultati non essere produttori di enterotossine di tipo A, B, C e D.
La ricerca di ceppi enterotossigeni di *Staphylococcus aureus* nelle fattrici con mastite costituisce un elemento importante per la possibilità dell'entrata nel ciclo produttivo di tossine potenzialmente agenti di tossinfezione alimentare. La carne di coniglio è infatti considerata fonte proteica di prima scelta in due categorie di età particolarmente a rischio, ossia la prima infanzia e i soggetti anziani.
Monitorare la presenza di ceppi di *Staphylococcus aureus* enterotossigeni negli allevamenti equivale a ridurre la possibilità di una eventuale circolazione all'interno della catena alimentare dell'uomo.

Il metodo sierologico adottato ha permesso di ottenere risultati in tempi rapidi ed in modo accurato, risultando un valido ausilio nella identificazione delle differenti enterotossine nei ceppi di *Staphylococcus aureus*.

BIBLIOGRAFIA

Balaban, N., Rasooly, A., 2000. Staphylococcal enterotoxins. Int. J. Microbiol. 61:1-10.

Bergdoll, M.S., 1967. The staphylococcal enterotoxins. In: R.I. Mateles, G.N. Wogan (eds) Biochemistry of some microbial toxins. MIT Press, Cambridge, pp. 1-25.

Casman, E.P., Bennett, R.W., Dorsey, A.E., Issa, J.A., 1967. Identification of a fourth Staphylococcal Enterotoxin, Enterotoxin D. J. Bacteriol. 94:1875-1882.

Winn, W.Jr., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G., 2006. Koneman's Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins Baltimore, pp. 623-649.

ENCEFALITOZOONOSI DEL CONIGLIO: APPROCCIO DIAGNOSTICO E CORRELAZIONE TRA GRADING MACRO-MICROSCOPICOSCOPICO, COLORAZIONE IMMUNOISTOCHIMICA E SIEROLOGIA

GIBELLI L., LAVAZZA A., TITTARELLI C., ROTA NODARI S., NASSUATO C., GELMETTI D.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B.Ubertini", Brescia, Italy
Lucia Gibelli, Laboratorio di Istologia, IZSLER, via Celoria 12, Milano, Italy
Tel. +39 02/70600153 - Fax: +39 02/70635837
*Corresponding author: luciarita.gibelli@izsler.it

ABSTRACT

Rabbit Encephalitozoonosis: diagnostic approach and correlation among grading, immunohistochemistry and serology

Encephalitozoonosis is an infection caused by a microsporidium, largely diffused in rabbit farms. This study is focused on the relationship among antibody titers, macro-microscopic kidney lesions and its immunolocalization using a pool of MAbs on 98 kidney samples. Immunohistchemistry may be considered the gold standard for *post mortem* diagnosis whereas macroscopic scoring is only a screening. The serological test has a lower diagnostic efficacy but is a good screening *in vitam.* However, it has no prognostic value since serological titres are not directly related to the severity of lesions.

Key words: Rabbit, CIA test, Kidney, Immunohistochemistry.

INTRODUZIONE

Encephalitozoon (E.) cuniculi è un microsporidio intracellulare obbligato che infetta roditori, lagomorfi, carnivori, primati e l'uomo (Künzel e Joachim, 2010). Le spore colonizzano l'epitelio intestinale, infettano i monociti ed entrano in circolo raggiungendo diversi organi, in particolare rene e cervello. Qui possono rimanere latenti, o riattivarsi, causando una patologia subclinica rivelabile solo con la siero conversione. Uno studio comparativo tra sierologia e lesioni macro-microscopiche ha dimostrato che: 1) in assenza di lesioni macroscopiche l'88% dei conigli era sieronegativo; 2) in presenza di nefrite l'85% degli animali era sieropositivo; 3) i grading delle lesioni macro-microscopiche concordavano (Tittarelli *et al.*, 2009). La correlazione tra nefrite e presenza di anticorpi suggeriva un'infezione da *E. cuniculi*, tuttavia i microsporidi non sono stati osservati nelle sezioni istologiche. Lo scopo del lavoro è correlare e valutare statisticamente il dato sierologico, le lesioni macro-microscopiche e la presenza del microsporidio nel rene con colorazione immuno-istochimica (IHC).

MATERIALI E METODI

La metodica sierologica (CIA Test), istologica e la gradazione delle lesioni (score), sono descritti nel lavoro di Tittarelli *et al.* (2009). Da 98 campioni: 23 di classe 0; 17 di classe 1; 20 di classe 2; 19 di classe 3; 19 di classe 4, sono state ottenute sezioni seriate di 4µm, incubate con un pool di 4 MAbs (EC8C12, EC10G4, EC11C5 e EC7D5) specifici verso *E. cuniculi* alla diluizione 1:100 (Mo e Drancourt., 2004). Le sezioni sono state analizzate in un sistema automatico Bond (Menarini) con il kit *Bond intense R detection* (3,3diaminobenzidina). Controlli positivi e negativi erano presenti. Per l'analisi statistica sono state riportate le distribuzioni percentili per il CIA test rispetto allo score macro-microscopico ed alla classificazione immunoistochimica. Il confronto tra il valore di CIA tra gruppi con diverso score è stato effettuato mediante analisi della varianza non parametrica. Sono state calcolate le stime dei valori di sensibilità e specificità diagnostiche con i relativi intervalli di confidenza al 95% del test CIA rispetto alla presenza/assenza di lesioni macroscopiche istologiche e rispetto a presenza/assenza di lesioni macroscopiche istologiche e/o positività immunoistochimica.

Tabella 1 – IHC in rapporto a quadro e sede delle lesioni.

IHC	q. acuto	q. cronico
totale negativa	17	17
totale positiva	20	21
rene negativa	28	28
rene positiva	9	10
pelvi negativa	18	20
pelvi positiva	19	18
Totale	**37**	**38**

RISULTATI E CONCLUSIONI

Nei 54 campioni di rene positivi in IHC, aggregati rotondeggianti, di colore marrone intenso, erano osservabili nel citoplasma di: cellule epiteliali dei tubuli prossimali e distali, macrofagi, cellule del connettivo lasso della pelvi renale, e liberi nel lume tubulare (Figura 1). Nella maggior parte dei campioni la positività era localizzata nella pelvi renale e in 20 di questi anche le cellule tubulari erano positive. Il confronto tra 37 soggetti con lesioni acute-subacute (score 1 e 2) e 38 con lesioni croniche (score 3 e 4) non ha evidenziato differenze significative nella distribuzione della positivi-

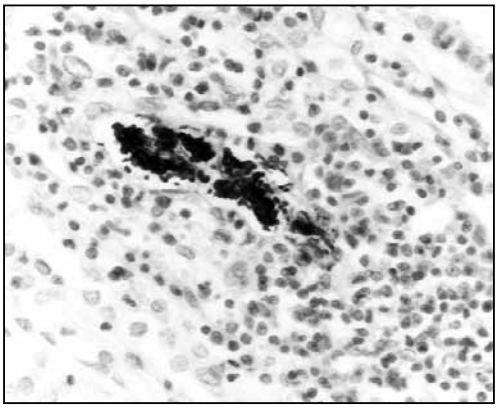

Figura 1 – Rene, IHC: aggregato di E. cuniculi nel lume tubulare. 400x.

tà IHC (rene e pelvi) anche se la positività era più frequente nelle cellule del connettivo della pelvi (Tabella 1). La correlazione tra gravità delle lesioni macro-microscopiche e titoli anticorpali è riportata in tabella 2 e figura 2. L'analisi dei dati mediante rank sum test di Kruskal-Wallis evidenzia una differenza significativa nel valore di CIA che è limitata al gruppo senza lesioni nei confronti di quello con lesioni (P<0,05). Non vi è invece differenza significativa nel valore di CIA tra i gruppi con score crescente (Figura 3). Prendendo come standard di riferimento l'assenza/presenza di lesioni macro-microscopiche, la sierologia mostra sensibilità 90,7 (IC95%: 81,7-96,1), specificità 86,9 (IC95%: 66,4-97,2).

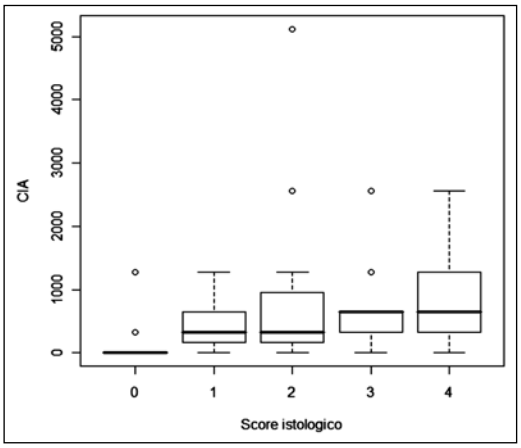

Figura 2

Tabella 2 – Score delle lesioni e sieropositività

CIA	Neg	Pos	min	1°quartile	mediana	3°quartile	max	media
Score 0	20	3	neg	neg	neg	neg	1280	126.1
Score 1	1	16	neg	160	320	640	1280	541 .2
Score 2	3	17	neg	160	320	800	5120	868.1
Score 3	1	18	neg	320	640	640	2560	707.4
Score 4	2	17	neg	320	640	1280	2560	1032.0
Score>0	*7*	*68*	*neg*	*320*	*640*	*1280*	*5120*	*794.8*

Tabella 3 – Positività IHC e sieropositività.

CIA	min	1°quartile	mediana	3°quartile	max	media
IHC rene neg	neg	neg	320	640	5120	643.5
IHC rene pos	neg	neg	640	1280	2560	621.1
IHC pelvi neg	neg	neg	320	1280	5120	703.1
IHC pelvi pos	neg	neg	320	640	2560	572.5
IHC totale neg	neg	neg	320	1280	5120	724.8
IHC totale pos	neg	neg	320	640	2560	566.9

La sieropositività è indicativa di presenza ma non di gravità delle lesioni; nello stesso tempo l'assenza di lesioni macro-micro-scopiche non esclude lo stato d'infezione e necessita quindi di diagnosi con IHC. La relazione tra titoli sierologici e IHC (Tabella 3), la sierologia non pare avere capacità discriminatoria rispetto all'assenza/presenza di *E. cuniculi* ovvero vi sono positività sierologiche in assenza di riscontri di positività in IHC e viceversa (Figura 4). Prendendo come standard di riferimento l'assenza/presenza di lesioni macro-microscopiche e/o il riscontro in IHC le performances dell'esame sierologico appaiono decisamente inferiori: sensibilità 78,4 (IC95%: 68,3-86,5), specifici-

tà 80,0 (IC95%: 44,4-97,5). Aumenta, infatti, sia la quota di soggetti infetti non rilevati come tali (falsi negativi) sia la quota di soggetti non infetti identificati come infetti (falsi positivi). Comparando i titoli anticorpali tra i soggetti positivi in IHC nel bacinetto renale rispetto ai negativi si evidenzia che i soggetti positivi hanno titoli mediamente più bassi rispetto ai negativi (566,9 *vs.* 724,8). Questi dati indirizzano verso l'ipotesi che *E. cuniculi* possa rimanere latente nelle cellule del connettivo lasso della pelvi renale.
In conclusione, l'IHC potrebbe diventare la metodica gold standard nella diagnosi *post mortem* di *E. cuniculi*, per la capacità di svelare i microsporidi anche in assenza di lesioni macroscopiche (classe 0). A tal fine la valutazione della pelvi renale non è da trascurare. Lo scoring macroscopico, ben correlato alle lesioni microscopiche, può fornire indicazioni diagnostiche ed ha valore di screening. Analogamente il test sierologico CIA può essere usato come screening *in vitam*, pur con numerosi limiti e minore efficienza diagnostica, ma non può avere valore prognostico, poiché la sieropositività è indicativa di presenza di *E. cuniculi* ma non di gravità delle lesioni.

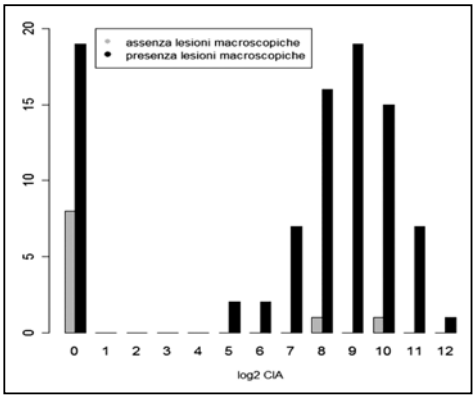

Figura 3 – Sierologia vs. lesioni.

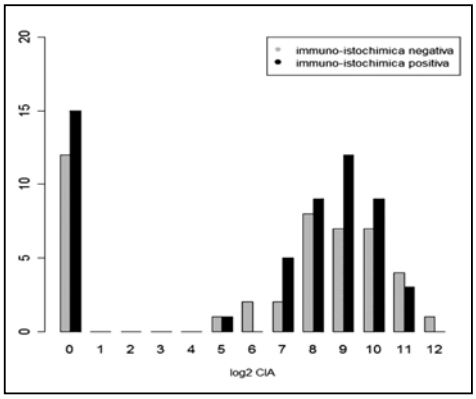

Figura 4 – Sierologia vs. IHC.

BIBLIOGRAFIA

Künzel, F., Joachim, A., 2010. Encephalitozoonosis in rabbits Parasitol. Res. 106:299-309.

Mo, L., Drancout, M., 2004. Monoclonal antibodies for specific detection of *Encephalitozoon cuniculi*. Clinical and diagnostic laboratory immunology, 11 (6), pp. 1060-1063.

Saviotti, M., Tamba, M., Gallazzi, D., Lavazza, A., 2000. Further data on the diffusion of *Encephalitozoon cuniculi* in Italian rabbitries. In: Proc. 7th World Rabbit Congress, Valencia, Spain, pp. 355-362.

Santaniello, A., Dipinto, L., Rinaldi, L., Menna, L.F., Cringoli, G., Fioretti, A., 2009. Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy. Res. Vet. Sci. 87:67-69.

Tittarelli, C., Gelmetti, D., Rota Nodali, S., Gibelli, L., Lavazza, A., 2009. Encephalitozoonosi del coniglio. Correlazione tra lesioni renali macro-microscopiche e titolo anticorpale in conigli al macello. Atti delle Giornate di coniglicoltura ASIC 2009, Forlì, pp. 81-84.

ENCEFALITOZOONOSI DEL CONIGLIO IN ALLEVAMENTI DELLA LOMBARDIA: PREVALENZA SIEROLOGICA E PARAMETRI DI CHIMICA CLINICA

LAVAZZA A.[1], CERIOLI M.[1], ARCHETTI I.L.[1], TITTARELLI C.[1], BRIVIO R.[2], NASSUATO C.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, "B. Ubertini", Brescia, Italy.*
[2]*Servizio SATA, Regione Lombardia, Italy*
Antonio Lavazza, Reparto di Virologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, via Bianchi 7/9, Brescia, Italy - Tel. +39 0302290298 - Fax: +39 030 2290623
*Corresponding author: antonio.lavazza@izsler.it

ABSTRACT

Rabbit encephalitozoonosis in industrial farms in Lombardy: seroprevalence and biochemical parameters

Encephalitozoonosis is an infection caused by *Encephalitozoon (E.) cuniculi*, largely diffused in industrial rabbit farms in Italy. This study is aimed to evaluate the seroprevalence for *E. cuniculi* in 10 industrial rabbit farms in Lombardy, and to verify the existence of any correlation between serological titres and the values of urea and creatinine, well-known parameters of renal function. Nulliparous (158), primiparous (10) and multiparous (74) does were tested separately: the overall prevalence was 30.63% and it was increasing with age. The values of creatinine and urea were higher in seropositive rabbits. The probability that animals showing values higher than normal are seropositive is almost double (OR 2.87 for creatinine and 1.71 for urea). In conclusion, *E. cuniculi* negatively influences the metabolism and productive performances of does and the urea and creatinine values are promising indicators of the severity of the infection in seropositive animals.

Key words: E.cuniculi, Serology, Urea, Creatinine.

INTRODUZIONE

Encephalitozoon (E.) cunicoli è un microsporidio gram+ intracellulare obbligato sporigeno, che infetta roditori, carnivori ed occasionalmente i primati e l'uomo. Le spore infettanti sono eliminate con l'urina; la trasmissione avviene per ingestione di acqua o cibo contaminati; dopo 4-5 settimane dall'infezione compaiono gli anticorpi circolanti. L'encefalitoozonosi del coniglio è una parassitosi cronica, spesso asintomatica ma riattivabile in seguito ad eventi stressanti. La forma acuta è caratterizzata da sintomi nervosi (in particolare torcicollo). Nella forma cronica i parassiti si localizzano nel rene e nel cervello in forma latente e le lesioni sono riscontrabili nei riproduttori a fine carriera nel rene (nefrite interstiziale, rene grinzo o ci-

stico) alla necroscopia o alla macellazione. L'encefalitozoonosi ha un effetto negativo negli allevamenti industriali dal punto di vista sanitario, del benessere animale e produttivo. Il danno economico, per incremento degli indici di mortalità, aumento delle femmine riformate e/o scarti, peggiori indici di conversione e calo della resa al macello, può essere rilevante ma è difficilmente correlabile in modo diretto a tale patologia. Tenuto conto delle sieroprevalenze (>60%) riscontrate in precedenti studi (Lavazza *et al*., 1996; Saviotti *et al*., 2000) e delle lesioni renali macro e microscopiche in soggetti sieropositivi (Tittarelli *et al*., 2008), si è deciso di valutare la sieroprevalenza nelle diverse categorie di riproduttori e di verificare se esisteva una correlazione tra sieropositività e valori di urea e creatinina quali indicatori della funzionalità renale. L'urea è un prodotto del catabolismo proteico ed è escreta dal rene nelle urine. La creatinina è un catabolita proteico prodotto dalla creatina muscolare ed è eliminata tramite filtrazione glomerulare a ritmo costante. Alte concentrazioni di urea e creatinina sono associate, nel coniglio, a danno renale (Harcourt-Brown, 2007).

MATERIALI E METODI

Tra il 2004 e il 2007, in 10 allevamenti intensivi della Lombardia, sono state campionate 242 fattrici distinte in: 158 nullipare, 10 primipare, 74 pluripare. I prelievi intracardiaci di 1,5-2 ml di sangue sono stati eseguiti sull'animale adeguatamente immobilizzato utilizzando una siringa da 2,5 ml e provette senza anticoagulante. Il siero, ottenuto previa centrifugazione a 3000rpm per 15 min, è stato suddiviso in due aliquote per l'analisi di biochimica clinica e per gli esami sierologici. Per la determinazione dei parametri biochimici, i sieri sono stati posti a 37°C in un random-access clinical analyzer (SYNCRON CX5-DELTA, Beckman Coulter, Fullerton, USA) utilizzando i kit forniti dallo stesso costruttore. La creatinina è stata determinata con metodo colorimetrico (Jaffè method), l'urea con metodo enzimatico colorimetrico (Ureasi) (Archetti *et al*., 2008). L'indagine per la presenza di anticorpi anti-*E. cunicoli* è stata eseguita mediante Carbon Immuno Assay (CIA test) utilizzando reagenti commerciali (Medicago SA). L'analisi statistica è stata effettuata con modelli di regressione logistica a effetti misti per tenere conto dell'eventuale correlazione tra dati provenienti da animali appartenenti allo stesso allevamento. Per l'analisi dell'eventuale relazione tra sieropositività e parametri biochimico-clinici si è fatto riferimento ai valori di normalità nelle singole classi di età/produttive: creatinina (in micromol/L) 82±19 nelle nullipare; 90±7 nelle primipare; 92±13 nelle pluripare, e urea (in mmol/L), rispettivamente 7,0±1,4; 9,8±1,08; 1±1,7. Sono state create delle variabili dicotomiche per creatinina e per urea che definissero se il soggetto era superiore o meno al valore massimo indicato, quali indici di alterata funzionalità renale. Le stime dell'associazione tra sieropositività e parametri chimico-clinici sono state calcolate in termini di odds ratio con i rispettivi intervalli di confidenza al 95%.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Sono risultati sierologicamente positivi 77 soggetti (31,8%). La stima di prevalenza, calcolata mediante il modello generalizzato a effetti misti, è pari a 30,63 (IC 95%: 16,23-50,47). Tra le 158 nullipare esaminate, 44 (27,8%) sono risultate positive, tra le pluripare 28 (37,8%) mentre era trascurabile il dato relativo alle primipare (50%), dato il numero esiguo (5). La situazione nei 10 allevamenti era molto variabile con prevalenze complessive tra i riproduttori comprese tra 0% e 70%: 0 (0-21,9); 2,1 (0,1-12,7); 31 (16-50,9); 34,6 (17,9-55,6); 35 (16,3-59,1); 38,1 (24-54,3); 40 (13,7- 72,6); 40 (13,7-72,6); 65,0 (IC 95% 40,9-83,7); 70 (45,7-87,1); I valori di creatinina e urea riscontrati all'esame biochimico sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1 – Valori di urea e creatinina in conigli sieropositivi e negativi per *E. cunicoli*.

	E. cunicoli	*minimo*	*1° quartile*	*valore mediano*	*3°quartile*	*massimo*	*valore medio*
Creatinina *(micromol/L)*	Pos	74,0	88,0	97,0	105,0	153,0	98,8
	N eg	47,0	72,0	85,0	96,0	168,0	85,6
Urea *(mmol/L)*	Pos	4,9	7,5	8,6	9,8	15,7	8,9
	Neg	4,3	6,5	7,4	8,8	13,6	7,8

Il valore mediano per la creatinina era pari a 89. Esaminando le distribuzioni percentili rispetto alla condizione di positività per *E .cunicoli* si evidenzia che in generale il livello di creatinina si mantiene più basso nei sieronegativi, eccezion fatta per il valore massimo. Il valore mediano per l'urea era pari a 8,1 ed anche in questo caso il livello si mantiene più basso nei sieronegativi. L'odds d'infezione da *E. cunicoli* è risultato 2,87 (IC 95%: 1,3- 6,2) volte più grande in soggetti con valore di creatinina al di sopra del valore soglia rispetto ai soggetti con valori inferiori o uguali. L'odds d'infezione per l'urea è risultato 1,71 (IC 95%: 0,87 - 3,36) volte più grande in soggetti con valore di urea al di sopra del valore soglia rispetto ai soggetti con valori al di sotto anche se il dato non risulta statisticamente significativo.
I risultati confermano la diffusione dell'infezione da *E. cuniculi* in allevamenti del Nord Italia, anche se il campione analizzato (65,3% nullipare, 4,1% primipare 30,6% pluripare) non rispecchia correttamente la popolazione di riproduttori degli allevamenti e porta ad un'inevitabile sottostima della prevalenza riscontrata (30,63%). Ad essere maggiormente infette sono solitamente le fattrici pluripare, per una più lunga permanenza in allevamento con conseguente stress produttivo e possibile riattivazione dell'infezione latente, ed un'esposizione continua a possibili fonti d'infezione. Infatti, in una precedente indagine la prevalenza era massima nelle pluripare (64,9%) e nei maschi (66,4%) mentre era del 41,8% nelle nullipare e primipare di 90-180gg (Saviotti *et al*., 2000). Nonostante la scarsa rappresentatività del campione, soprattutto per le primipare, si evidenzia una tendenza all'aumento della prevalenza con il progredire del numero di parti e quindi con l'età. Nel contempo si può ragionevolmente affermare che valori più elevati di urea e creatinina siano indicativi di sieropositività. Infatti, la probabilità che un soggetto che presenta valori superiori ai valori di riferimento, sia per creatinina sia per urea, sia sieropositivo è circa 2 volte maggiore di un

soggetto con valori nella norma. Una migliore pianificazione dei prelievi consentirà in futuro di indagare le ragioni di così sensibili differenze (da 0 a 70%) nelle prevalenze da un allevamento all'altro e quindi di verificare se vi siano eventuali e più significative differenze nei valori biochimici di urea e creatinina. L'encefalitozoonosi è una patologia cronica latente, pertanto gli animali sieropositivi non presentavano alcun sintomo clinico. L'assenza di manifestazioni cliniche è imputabile al controllo dell'infezione da parte dell'immunità. Un abbassamento delle difese immunitarie dell'ospite, ad esempio in concomitanza con fattori stressanti, può determinare la forma clinica della malattia. A prescindere dalla comparsa di malattia conclamata, è però chiaro che la presenza di lesioni renali si traduce in un alterato metabolismo, prova ne sono gli alterati valori di urea e creatinina, che certamente condiziona in senso negativo le performances produttive. E' quindi giustificata una maggiore attenzione alla presenza e diffusione dell'infezione da *E. cunicoli* negli allevamenti di conigli.

BIBLIOGRAFIA

Archetti, I., Tittarelli, C., Cerioli, M., Brivio, R., Grilli, G., Lavazza, A., 2008. Serum chemistry and hematology values in commercial rabbits: preliminary data from industrial farms in North Italy. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, pp. 1147-1152.

Harcourt-Brown, F., 2007. Radiographic signs of renal disease in rabbits. Vet. Rec. 160:787-794.

Lavazza, A., Tinelli, F., Zanon, F., Massirio, I., 1996. A seroepidemiological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in different Italian rabbitries. In: Proc. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, France, 3:81-87.

Saviotti, M., Tamba, M., Gallazzi, D., Lavazza, A., 2000. Further data on the diffusion of *Encephalitozoon cuniculi* in Italian rabbitries. In: Proc. 7th World Rabbit Congress, Valencia, Spain, B:355-362.

Tittarelli, C., Gelmetti, D., Rota Nodali, S., Gibelli, L., Lavazza, A., 2009. Encephalitozoonosi del coniglio. Correlazione tra lesioni renali macro-microscopiche e titolo anticorpale in conigli al macello. In: Atti delle Giornate di Coniglicoltura ASIC 2009, Forlì, Italia, pp. 81-84.

INTERESSE ECONOMICO DELLA PREVENZIONE DELLA COCCIDIOSI NEL CONIGLIO: STUDIO DI CAMPO

VANCRAEYNEST D.

Alpharma Animal Health, Antwerp, Belgium
Dieter Vancraeynest, Alpharma Animal Health, Laarstraat 16, 2610 Antwerp, Belgium
Tel. +32 32870465 - Fax: +32 32873881
*Corresponding author: dieter.vancraeynest@alpharma.com

ABSTRACT

Economics of coccidiosis prevention in rabbits: a field study

Coccidiosis is an important digestive disorder in rabbits but its economic impact is not easy to assess. A correct idea of the cost is necessary to take appropriate management decisions – such as disease prevention – to optimise revenue. The present paper describes a trial that gives insights in the return on investment of coccidiosis prevention. The trial was performed in a commercial farm where no signs of clinical coccidiosis were noted and where no anticoccidial was used in the feed during several years prior to the trial. It involved a group supplemented with an anticoccidial – robenidine - and a non-supplemented group. A zootechnical and parasitological comparison was made. This trial showed significant reduction of the feed conversion rate in robenidine supplemented animals. An economic analysis showed the benefits of anticoccidial supplementation.

Key words: Rabbit, Coccidiosis, Prevention, Economic analysis.

INTRODUZIONE

La coccidiosi del coniglio è causata da alcune specie di coccidi appartenenti al genere *Eimeria*. Ha un impatto diretto sulle performance di produzione, ma agisce anche in sinergia con l'Enteropatia Epizootica del coniglio (ERE) (Coudert *et al*., 2000). Non è facile stimare l'esatto impatto finanziario della malattia. Nei broiler, alcuni studi hanno dimostrato che la maggior parte (70-80%) dei costi della coccidiosi è determinata dalle forme subcliniche della malattia (Williams, 1999; Waldenstedt, 2004). Nei conigli, non ci sono dati disponibili relativi al costo della coccidiosi subclinica. Un possible metodo per stimare l'impatto economico di una malattia è quello di confrontare le performance di un gruppo di animali nei quali sono state attuate misure preventive con quelle di un gruppo nei quali non è stata effettuata alcuna prevenzione verso la malattia stessa. Il presente lavoro descrive questo tipo di prova nei conigli, in un gruppo nel quale non sono stati rilevati in precedenza segni clinici di coccidiosi e dove da diversi anni non è stato somministrato anticoccidico nell'alimento.

Nella seguente prova, un gruppo di conigli è stato trattato con robenidina, mentre il gruppo di controllo non è stato trattato.

MATERIALI E METODI

La prova è stata eseguita in un allevamento commerciale di conigli ed ha coinvolto tre cicli di conigli all'ingrasso. Per evitare il più possibile gli effetti ambientali, il gruppo di prova e quello di controllo sono stati allevati a rotazione in diverse file di gabbie durante i tre cicli di produzione. La prova è stata condotta su 6000 animali, suddivisi in 2 gruppi di 1000 animali per ciclo, per tre cicli consecutivi. Per massimizzare l'uniformità dei gruppi, i conigli sono stati assegnati ad ogni gruppo in base a tre criteri: provenienza, peso e parità della nidiata. I conigli sono stati posti in gabbie contenenti 6 conigli l'una. Alle madri dei due gruppi gruppi è stata somministrata robenidina (66 ppm) dal 5° giorno prima del parto fino allo svezzamento nei cicli 1 e 2. Nel ciclo 3, solo il 60% degli animali da ingrasso proveniva da fattrici trattate con robenidina fino allo svezzamento. Il mangime di entrambi i gruppi è stato supplementato con 50 ppm di tiamulina e 400 ppm di ossitetraciclina per i primi 29 giorni di ingrasso. Il gruppo trattato ha ricevuto mangime medicato a concentrazione di 66 ppm di robenidina, mentre il gruppo di controllo non ha ricevuto nessun anticoccidico. Sono stati rispettati 5 giorni di tempo di sospensione. I conigli sono stati pesati all'inizio e alla fine del ciclo di ingrasso, e, nelle fasi intermedie, ad intervalli settimanali. Sono stati controllati giornalmente i seguenti parametri: consumo di alimento, mortalità ed è stato calcolato l'indice di conversione alimentare (ICA). Nei giorni 5, 9 e 16 post svezzamento, è stata eseguita la conta delle oocisti per grammo (OPG) in pool di feci di 18 animali per gruppo. E' stata inoltre eseguita un'analisi economica, basata sul costo del mangime per coniglio.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Nel ciclo 1, entrambi i gruppi, trattato e controllo, hanno mostrato alti valori di OPG in uno dei campioni prelevati (68000 e 35000 rispettivamente). Al ciclo 2, le OPG sono risultate più basse rispetto al ciclo 1 e nel gruppo trattato le OPG erano da 2 a 10 volte più basse rispetto al gruppo di controllo, variando in base al momento di campionamento. Considerando tutti e 3 i campioni del ciclo 3, le OPG erano inferiori al limite di sensibilità (≤1100) e quasi similari tra i due gruppi. Non sono risultate differenze significative nei confronti della mortalità, peso finale e incremento del peso giornaliero tra i gruppi trattati e di controllo durante i tre cicli. Tuttavia, tutti e 3 i cicli hanno rilevato differenze molto significative in IC, i quali sono risultati fino a 8,6% più bassi nei gruppi trattati (Tabella 1). Il significativo abbassamento di IC nel gruppo trattato, è stato l'unico risultato evidente in tutti e tre i cicli. Visto che non erano evidenti segni clinici di coccidiosi sia nel gruppo trattato che in quello di controllo, nonostante il rilevamento di oocisti nelle feci, questa differenza di IC è da imputare, con ogni probabilità, ad un miglior controllo della coccidiosi

subclinica in seguito alla somministrazione di robenidina. Questo miglior controllo della coccidiosi non è stato completamente osservato nella conta delle OPG: solo il ciclo 2 ha mostrato valori di OPG più bassi nel gruppo trattato rispetto a quello di controllo, in tutti e tre i campionamenti. Questo può significare che la stima delle OPG, nel coniglio, non sia direttamente correlata alle performance, come accade nei polli (Williams, 2001), o che ci siano altri effetti relativi al trattamento che possano avere un ruolo importante.

Tabella 1 – Indice di conversione alimentare (ICA).

Ciclo	Gruppo trattato	Gruppo di controllo	Probabilità
1	2,91	3,16	<0,01
2	2,66	2,84	<0,01
3	2,75	3,01	<0,01

Nella prova di campo descritta, la somministrazione di un anticoccidico ha portato ad una consistente riduzione di ICA, ciclo dopo ciclo. Questo risultato, molto probabilmente, è dovuto ad una riduzione della coccidiosi subclinica nel gruppo trattato. Di seguito si riporta una simulazione dell'impatto economico di un così ridotto ICA applicato a 1000 conigli (Tabella 2). Il valore di ICA utilizzato nella simulazione è la media matematica di IC ottenuta nei tre cicli di prova: 2.77 per il gruppo di prova e 3.00 per il gruppo di controllo. Per semplificare la simulazione, il solo parametro che cambia tra i gruppi è l'ICA, in conformità con la prova sopra descritta, in considerazione del fatto che l'ICA è stato l'unico parametro per il quale sia stata notata una significativa e consistente differenza durante ogni ciclo.

Tabella 2 – Valutazione economica su 1000 conigli all'ingrasso.

	Trattato	Controllo
Peso iniziale del coniglio da carne (kg)	0,8	0,8
Peso finale del coniglio da carne (kg)	2,3	2,3
Accrescimento/coniglio (kg)	1,5	1,5
Accrescimento totale per 1000 animali(kg)	1.500	1.500
Mangime necessario per l'accrescimento (kg)	1500 × 2,77 = 4155	1500 × 3,00 = 4500
Mangime: prezzo/tonnellata (€)	240	240
Mangime: costo totale (€)	997	1080
Mangime necessario per almeno 5 giorni di allevamento (supposto che sia circa il 15% del totale) (kg)	0,15 × 4155 = 623	0,15 × 4500 = 675
Mangime medicato con robenidina (kg), rispettando 5 giorni di tempo di sospensione	4155 – 623 = 3532	0
Prezzo dell'anticoccidico/tonnellata (€)	6,8	Non applicable
Costo totale dell'anticoccidico (€)	3,532 × 6,8 = 24	0
Costo totale per l'alimentazione di 1000 conigli (€)	1021	1080

Il ragionamento descritto dimostra che l'investimento di un anticoccidico, nel caso riportato, potrebbe generare un beneficio di 1080 – 1021 = 59 €/1000 conigli da carne, che è una differenza considerevole. L'esperienza, in altre specie animali, insegna che le più importanti perdite dovute alla coccidiosi sono determinate dalle forme subcliniche della malattia. La prova descritta porta alle stesse conclusioni anche per i conigli: nonostante nessun segno clinico di coccidiosi sia stato osservato nell'allevamento della prova, la somministrazione di mangime medicato con robenidina ha determinato un significativo e consistente riduzione di ICA. In un'era di sempre maggior incremento dei prezzi delle materie prime, questo favorisce il guadagno netto degli allevatori di conigli.

BIBLIOGRAFIA

Coudert, P., Licois, D., Zonnekeyn, V., 2000. Epizootic rabbit enterocolitis and coccidiosis: a criminal conspiracy. In: Proc. of the 7th World Rabbit Congress, Valencia, Spain, B:215-218.

Waldenstedt, L., 2004. An estimation of the cost of coccidiosis to Swedish broiler production. In: Proc. of the XXII World's Poultry Congress, Istanbul, Turkey.

Williams, R. B., 1999. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. Int. J. Parasitol. 29:1209-1229.

Williams, R. B., 2001. Quantification of the crowding effect during infections with the seven *Eimeria* species of the domesticated fowl: its importance for experimental designs and the production of oocyst stocks. Int. J. Parasit. 31:1056-1069.

STUDIO LONGITUDINALE SULL'ESCREZIONE DI COCCIDI IN CONIGLI DI AZIENDE INDUSTRIALI CHE APPLICANO UNO SCHEMA DI TRATTAMENTO ANTICOCCIDICO BIFASICO

VEREECKEN M.[1], CHIARI M.[2], TITTARELLI C.[2], BERTINATO F.[3], ZUFFELLATO A.[3], ZANONI M.[2], SCHIAVI P.[1], DE GUSSEM K.[1], LAVAZZA A.[2]

[1]*Huvepharma NV, Belgium.*
[2]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini", Brescia, Italy.*
3AIA SpA - Gruppo Veronesi, Italy
Vereecken Monita, Huvepharma NV, Uitbreidingstraat 80, 2600 Antwerp, Belgium - Tel/Fax: +32479820008
*Corresponding author: monita.vereecken@huvepharma.com

ABSTRACT

Longitudinal study on the excretion of coccidian in rabbit farms applying an anticoccidials two-phase treatment

A one-year study was carried to evaluate the excretion of coccidia in fattening rabbits from 8 meat farms applying a two-phase anticoccidial program (diclazuril+robenidine). Parasitological parameters (counts of oocysts and species identification) were measured monthly. Seven out of the 11 known rabbit species were identified. Variable levels of OPG were detected in the farms but in all them, after eight months of treatment with diclazuril a lower OPG and a reduced number of *Eimeria* species in rabbit feces were recorded.

Key words: Rabbit, Eimeria sp., Longitudinal study, Coccidiostatics.

INTRODUZIONE

La coccidiosi rappresenta la principale parassitosi del coniglio (Peeters, 1987). Tutte le undici specie di coccidi del coniglio appartengono al genere *Eimeria* e replicano nei vari tratti dell'intestino, tranne *E. stiedai* che replica nel fegato. La coccidiosi colpisce soprattutto i soggetti all'ingrasso dallo svezzamento ai 3-4 mesi di età. La diagnosi si basa sull'esame delle feci per la conta delle oocisti e, poiché la patogenicità è variabile (4 classi di virulenza) sull'identificazione di specie (Coudert *et al.*, 1995). Questa è basata sulla morfologia delle spore, è eseguita dopo sporulazione e non è sempre facile per la variabilità di forma e dimensione delle sporocisti nell'ambito di ciascuna specie. Per contenere la gravità dell'infezione oltre alle norme generali di profilassi diretta si utilizzano farmaci ad attività anticoccidica quali robenidina, diclazuril, salinomicina, sulfonamidi. La possibilità dell'istaurarsi di fenomeni di farmaco-resistenza ha suggerito l'utilizzo di principi attivi "a rotazione" (Peeters e Geeroms, 1992). Scopo di questo lavoro è descrivere in via

preliminare i parametri parassitologici, di uno studio longitudinale basato sull'uso in rotazione nell'arco di un anno di due molecole (robenidina e diclazuril), in allevamenti intensivi di conigli dislocati nel Nord-Est. Inoltre, si è voluto valutare l'efficacia del diclazuril in caso di uso continuato per un tempo >6 mesi e l'eventuale comparsa di fenomeni di resistenza.

MATERIALI E METODI

Conigli ibridi commerciali all'ingrasso (35-80gg) erano alimentati *ad libitum* con mangime medicato con diclazuril (1 ppm) dal 17/09/09 al 16/05/2010 (T1) e con robenidina HCl (50-66 ppm) dal 17/05/2010 fino ad agosto 2010, termine della sperimentazione (T2). I prelievi delle feci erano eseguiti con cadenza mensile, nella stessa settimana e nella stessa fascia oraria, in 8 allevamenti, raccogliendo un pool di 100g di feci da 60 capi all'ingrasso presenti (12-15 gabbie a random) tramite reti a maglia fine poste al di sotto delle gabbie. I 96 pool di feci erano omogenati in Stomacher e quindi sottoposti a esame parassitologico quantitativo (metodo Mc Master) e qualitativo. L'identificazione microscopica delle oocisti avveniva dopo sporulazione in soluzione acquosa al 2,5%p/v di dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$). La frequenza delle specie era determinata su 100 oocisti visualizzate. L'identificazione delle specie di *Eimeria* utilizzava i parametri morfometrici (Eckert *et al*., 1995).

RISULTATI E CONCLUSIONI

L'andamento dell'eliminazione di oocisti nelle feci (oocisti per grammo = OPG) negli 8 allevamenti è riportato in tabella 1. I valori di OPG all'inizio dello studio (T0) variavano da un minimo di 100 (azienda F) a un massimo di 118.800 (azienda C). Un mese dopo l'inizio dell'utilizzo del diclazuril (T1) il valore massimo registrato è stato di 28.000 (azienda D). Questa riduzione nell'eliminazione di oocisti è un probabile effetto positivo del cambio di principio attivo anticoccidico. Salvo l'azienda D, per tutta la durata di T1 (8 mesi), i valori di OPG non sono mai stati superiori a 43.000 oocisti/gr di feci. È stato possibile osservare un lieve aumento nell'eliminazione di oocisti al T2 che si è poi confermato e intensificato in tutte le aziende raggiungendo valori di 46.800 nell'azienda C.

Tabella 1 – Andamento OPG per azienda (da A a H).

Mese	A	B	C	D	E	F	G	H
Set 09	1200	89250	118800	51700	4300	100	48500	43950
Ott 09	200	4200	0	28000	0	2400	5200	2200
Nov 09	100	200	40800	1800	0	200	500	1100
Dic 09	0	0	9600	110600	0	400	3800	0
Gen 10	0	100	23500	4550	100	100	1500	0
Feb 10	200	650	18900	7300	0	200	0	300

Mese	A	B	C	D	E	F	G	H
Mar 10	100	800	9400	274000	400	1200	500	0
Apr 10	0	0	1400	200	0	0	0	0
Mag10	300	200	10500	1800	0	500	100	0
Giu 10	2200	0	46800	10100	0	34200	3300	2400
Lug 10	700	1500	39700	6700	200	3100	9800	9600
Ago 10	14100	47700	24500	4800	3900	2900	800	4400

Dopo sporulazione, sono state identificate sette specie di *Eimeria:* sei intestinali, di cui una non patogena (*E. coecicola),* due poco patogene *(E. perforans, E. esigua*) e tre mediamente patogene (*E. media, E. magna, E. irresidua)*, più *E. stiedai* epatica. Non sono state identificate specie altamente patogene (*E. intestinalis* e *E. flavescens*). In tabella 2 è riportata la prevalenza delle diverse specie e il numero degli isolamenti per ciascuna specie nelle singole aziende nell'arco dei 12 mesi d'indagine. Rispetto ai dati di Coudert *et al.* (2003) si osservava una frequenza inferiore di *E. magna* (12,9 *vs.* 33,0%), maggiore di *E. perforans* (30,6 *vs.* 10,0%), e circa uguale di *E. media* (38,8 *vs.* 44,0%). La distribuzione delle positività per numero di specie a ciascun campionamento è riportata in tabella 3.

Tabella 2 – Prevalenza totale e numero degli isolamenti per specie nelle singole aziende.

Specie	Azienda/n°di individuazioni								%
	A	B	C	D	E	F	G	H	
E. coecicola	0	0	2	4	0	0	0	0	4,1
E. perforans	4	6	9	8	3	4	6	5	30,6
E. exigua	0	2	1	2	0	0	1	1	4,8
E. media	7	8	10	8	2	9	8	5	38,8
E. magna	2	1	4	3	1	2	2	3	12,9
E. irresidua	2	1	0	0	0	0	1	1	3,4
E. stiedai	0	1	2	1	0	0	2	2	5,4
Tot. specie	4	6	6	6	3	3	6	6	100

Tabella 3 – Distribuzione delle positività per numero di specie.

N° specie	N°momenti campionari	%	% (Coudert *et al.,* 2003)
0	22	23	13
1	33	34	32
2	19	20	45
3	13	14	10
4	8	8	0
5	1	1	0
Totale	96	100	100

Il valore di OPG tendenzialmente aumentava con l'incremento di numero di specie identificate a ogni campionamento (Figura 1).

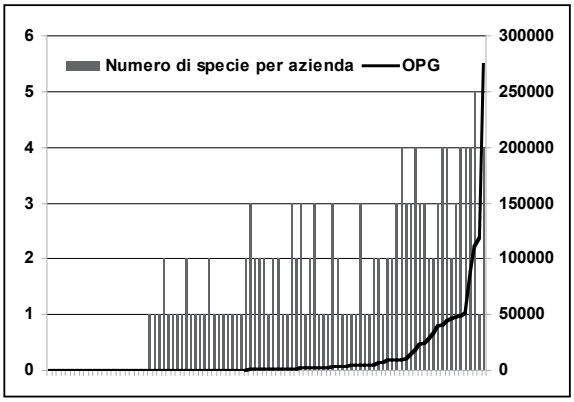

Figura 1 – Rapporto OPG/N° di specie.

Il numero di diverse specie osservate mensilmente (Figura 2) era pari a 7 a T0, variava da 5 (inizio periodo) a 1 (fine periodo) nel T1, per aumentare a 4 ad inizio T2. L'analisi dell'OPG in rapporto all'età degli animali campionati non ha evidenziato alcuna correlazione significativa; analogamente non vi era alcuna correlazione diretta tra l'età dei conigli, aggregati in due classi di età (36-54gg e 55-85gg), ed il numero di specie. L'uso continuato per un periodo di 8 mesi ha permesso di confermare l'efficacia del diclazuril per un periodo superiore a quanto inizialmente ipotizzato (6 mesi).

In conclusione si conferma l'utilità di un programma di prevenzione della coccidiosi basato sulla rotazione di principi farmacologici. A prescindere dall'efficacia dei singoli principi impiegati, alternando i prodotti si riducono i valori di OPG, si limita il numero di specie di *Eimeria* presenti e si riduce anche la possibilità di fenomeni di resistenza. I risultati preliminari di questo studio andranno in futuro integrati da una valutazione dei parametri zootecnici.

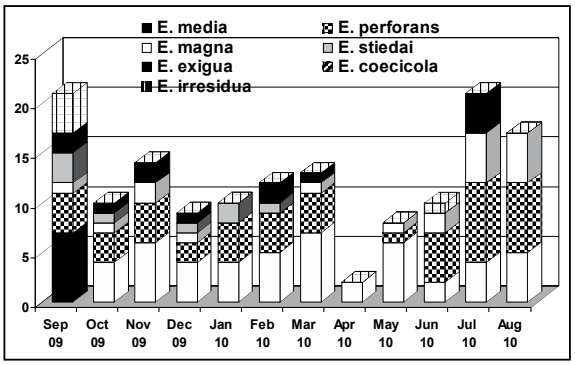

Figura 2 – Specie osservate mensilmente.

BIBLIOGRAFIA

Coudert, P., Licois, D., Drouet-Viard, F., 1995. Eimeria species and strains of rabbits. In: J. Eckert, R. Braun, M.W. Shirley, P. Coudert (eds) Guidelines on techniques in coccidiosis research. COST 89/820 Biotechnology, pp. 52-73.

Coudert, P., Jobert, J.L., Larour, G., Guittet, M., 2003. Relation entre l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) et l'infestation par des coccidies: enquête épidémiologique. Cuniculture Magazine 30:30-33.

Eckert, J., Taylor, M., Catchpole, J., Licois, D., Coudert, P., Bucklar, H., 1995. Identification of *Eimeria* species and strains. Morphological characteristics of oocysts.

In: Eckert J., R. Braun, M.W. Shirley, P. Coudert (eds), COST 89/820 Biotechnology, pp. 113-116.

Peeters, J.E., 1987. Etiology and pathology of diarrhoea in weaning rabbits. In: M.T. Auxilia (ed) Rabbit production system including welfare. CEE, Luxemburg, pp. 127-137.

Peeters, J.E., Geeroms R., 1992. Efficacy of a rotation program with anticoccidials clopidol/methylbenzoquate and robenidine and evolution of coccidial infection in rabbit between 1982 and 1990. J. Appl. Rabbit Res. 15:1360-1365.

Sessione Qualità della Carne

IMPIEGO DELLA MARINATURA PER LA VALORIZZAZIONE DELLE CARNI DI CONIGLIO

PETRACCI M., RIMINI S., BIGUZZI G., CAVANI C.

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna, Italy
Massimiliano Petracci, Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna,
P.zza Goidanich 60, 47522 Cesena (FC), Italy - Tel. +39 0547 338128 - Fax: +39 0547 382348
*Corresponding author: m.petracci@unibo.it

ABSTRACT

The use of marination to provide added-value rabbit meat

A study was conducted to determine the effects of marination use and marination solutions (containing sodium tripolyphosphate, sodium carbonate or sodium bicarbonate) on rabbit meat quality traits. The pH, colour (L*a*b*), drip losses, cooking losses and shear force were measured on a total of 48 *L. lumborum* muscles. Irrespective of the type of solution, marination allowed to reduce cooking loss (18.4 *vs*. 20.0%; P<0.05), by increasing its pH, and tenderize loin rabbit meat by about 25% (shear force: 1.37 *vs*. 1.83 kg/g; P<0.01). Among marination ingredients, sodium carbonate and bicarbonate showed an higher alkalinisation effect in respect to sodium tripolyphosphate; however colour traits, water holding capacity and shear force of meat were not different among treatments. In conclusion, this study showed that marination can be profitably used in rabbit meat to prepare further processed products and sodium carbonate and bicarbonate can be used as alternative to phosphates.

Key words: Rabbit, Meat, Marination, Processed products.

INTRODUZIONE

Nel settore della carne le preferenze del consumatore si orientano sempre più verso prodotti elaborati e di facile preparazione. Questa tendenza è stata ben interpretata dal settore avicolo che in questi anni ha fortemente investito nel settore dei prodotti elaborati (ready-to-eat e ready-to-cook) al fine di dare valore aggiunto alle materie prime. Al contrario nel settore cunicolo è ancora preponderante la commercializzazione delle carni sotto forma di carcassa intera e prodotti sezionati e ciò rappresenta un vincolo al consumo nazionale di carne di coniglio che è stagnante da diversi anni (Cavani *et al*., 2009). La marinatura è uno dei più antichi processi di preparazione e conservazione delle carni, ma ha trovato solo di recente una applicazione industriale. Lo scopo principale della marinatura è quello di migliorare le caratteristiche sensoriali delle carni, soprattutto tenerezza, succulenza e flavour (Alvarado e McKee, 2007). L'applicazione della marinatura è particolarmente promettente sulle carni cunicole

che, essendo molto magre e avendo bisogno di cotture prolungate, possono manifestare al momento del consumo scarsa succulenza ed eccessiva fibrosità. Il presente studio si è quindi proposto di valutare l'effetto della marinatura e del tipo di additivo funzionale (sodio tripolifosfato, carbonato di sodio o bicarbonato di sodio) sulle caratteristiche qualitative delle carni di coniglio.

MATERIALI E METODI

Per la prova sono stati impiegati 48 conigli (Ibrido Martini, 76 d d'età e peso carcassa pari a 1,56 kg) appartenenti al medesimo lotto e dai quali 48 h *post mortem* sono stati sezionati i rispettivi muscoli *Longissimus lumborum*. I campioni sono stati suddivisi in quattro gruppi (12/gruppo) omogenei per pH e colore e successivamente tre di essi sono stati sottoposti a marinatura impiegando soluzioni contenenti la medesima concentrazione di cloruro di sodio (0,5%) e che differivano unicamente per un additivo funzionale: sodio tripolifosfato (0,1%, STTP), carbonato di sodio (0,1%, CAR) e bicarbonato di sodio (0,1%, BIC). I campioni di ciascun gruppo sono stati confezionati in sacchetti sottovuoto con la relativa soluzione di marinatura, impiegando un rapporto soluzione/carne pari al 10% (p/p) e sottoposti a zangolatura in condizioni commerciali per 1 h, alternando periodi di lavoro e pausa. Il rimanente gruppo non è stato sottoposto ad alcun trattamento (Controllo). Al fine di valutare le principali caratteristiche chimico-fisiche delle carni, sono state condotte le seguenti determinazioni: pH (Jeacocke, 1977) e colore (L*, a*, b*) dopo il trattamento di marinatura, perdite di gocciolamento (drip loss) e di cottura (coking loss), nonché sforzo di taglio della carne dopo cottura (Bianchi *et al*., 2007). I dati ottenuti sono stati elaborati mediante ANOVA a un criterio di classificazione. Le differenze tra le medie delle variabili sono state saggiate mediante contrasti ortogonali.

RISULTATI E CONCLUSIONI

In tabella 1 è riportato l'effetto del trattamento di marinatura sulle caratteristiche chimico-fisiche delle carni.

Tabella 1 – Caratteristiche chimico-fisiche delle carni di coniglio sottoposte a marinatura.

Trattamento	Parametri chimico-fisici						
	pH	L*	a*	b*	Drip loss (%)	Cooking loss (%)	Sforzo di taglio (kg/g)
Controllo (C)	6,06	47,0	1,26	-0,58	0,49	20,0	1,83
Marinate (M)							
- STPP	6,05	49,2	1,06	-0,10	0,65	19,5	1,42
- CAR	6,36	48,6	2,01	0,20	0,56	17,6	1,34
- BIC	6,25	47,3	1,30	-0,21	0,61	18,0	1,36
e.s.m.	*0,03*	*0,62*	*0,15*	*0,14*	*0,02*	*0,44*	*0,05*

Trattamento	Parametri chimico-fisici						
	pH	L*	a*	b*	Drip loss (%)	Cooking loss (%)	Sforzo di taglio (kg/g)
Probabilità dei confronti ortogonali							
C vs. M	*	*ns*	*ns*	*ns*	**	*	**
STPP vs. CAR	**	*ns*	*	*ns*	*ns*	*ns*	*ns*
STTP vs. BIC	*	*ns*	*ns*	*ns*	*ns*	*ns*	*ns*
CAR vs. BIC	*ns*	*ns*	*ns*	*ns*	*ns*	*ns*	*ns*

ns = non significativo; * = P<0,05; ** = P<0,01

Le carni marinate (M) hanno mostrato mediamente un pH più elevato rispetto al gruppo di controllo (C) (6,22 *vs*. 6,06; P<0,05). Tale variazione di pH non ha tuttavia determinato una modificazione significativa di alcuno degli indici colorimetrici (L*, a*, b*). Le carni marinate hanno mostrato un aumento delle perdite di gocciolamento (0,61 *vs*. 0,49%; P<0,01) rispetto alle carni non trattate, mentre le perdite di cottura sono risultate inferiori (18,4 *vs*. 20,0%; P<0,05). È da sottolineare che se nelle carni di controllo la capacità di ritenzione idrica è riferita solo all'acqua di costituzione, nelle carni marinate è compresa anche la frazione assorbita durante il processo di zangolatura. Pertanto questi risultati confermano l'efficacia funzionale degli additivi STPP, CAR e BIC in associazione al cloruro di sodio nel favorire il processo di assorbimento e ritenzione dei liquidi di marinatura come in precedenza riscontrato nella carni avicole (Sen *et al*., 2005; Petracci *et al*., 2010) e suine (Bertram *et al*., 2008). In particolare, Bertram *et al*. (2008) hanno attribuito l'azione favorevole svolta dal sodio bicarbonato alla capacità di ridurre l'entità dello contrazione a carico della matrice proteica durante la cottura, mentre è noto da tempo (Alvarado e McKee, 2007) che i polifosfati favoriscono l'estrazione e la solubilità delle proteine della carne migliorandone la capacità di trattenere l'acqua endogena ed eventualmente aggiunta durante la lavorazione. Il risultato più interessante è tuttavia rappresentato dal fatto che la marinatura ha consentito di ridurre di quasi il 25% i valori di sforzo di taglio delle carni rispetto a quelle non sottoposte a marinatura (1,37 *vs*. 1,83 kg/g; P<0,01). Ciò conferma la validità di questa tecnica di lavorazione per il miglioramento della tenerezza delle carni di coniglio in accordo con quanto osservato precedentemente sulle carni avicole (Petracci *et al*., 2010).

Dal confronto fra i diversi additivi funzionali, a parità di dosaggio, il carbonato ed il bicarbonato di sodio hanno mostrato un maggior potere alcalinizzante rispetto al tripolifosfato di sodio. Tali differenze sono attribuibili essenzialmente alla diversa forza ionica e capacità tampone come ipotizzato anche da Sen *et al*. (2005) e confermano quanto riscontrato precedentemente in carni di pollo marinate con sodio polifosfato e sodio bicarbonato (Petracci *et al*., 2010). I parametri relativi a colore, capacità di ritenzione idrica e sforzo di taglio non sono risultati significativamente diversi fra i trattamenti studiati, ad eccezione dell'indice di rosso che è apparso più elevato nelle carni marinate con sodio carbonato rispetto al sodio tripolifosfato. Pertanto l'impiego di carbonato e bicarbonato di sodio può trovare una valida applicazione nella preparazione di prodotti a base di carne di coniglio in alternativa al so-

dio tripolifosfato, il cui impiego nel settore della trasformazione delle carni è fortemente messo in discussione.
In conclusione, la tecnica di marinatura adottata nel presente studio si è rivelata efficace per favorire l'assorbimento e la successiva ritenzione delle soluzioni di marinatura e ciò ha consentito di migliorare notevolmente la tenerezza delle carni senza pregiudicarne l'aspetto.

BIBLIOGRAFIA

Alvarado, C.Z., McKee, S.R., 2007. Marination to improve functional properties and safety of poultry meat. J. Appl. Poult. Res. 16:113-120.

Bertram, H.C., Meyer, R.L., Wu Z., Zhou X., Andersen J.H., 2008. Water distribution and microstructure in enhanced pork. J. Agric. Food Chem., 56:7201-7207.

Bianchi, M., Petracci, M., Pascual, M., Cavani, C., 2007. Comparison between Allo-Kramer and Warner-Bratzler devices to assess rabbit meat tenderness. Ital. J. Anim. Sci. 6(suppl. 1):749-751.

Cavani, C., Petracci, M., Trocino, A., Xiccato, G., 2009. Advances in research on poultry and rabbit meat quality. Ital. J. Anim. Sci., 8(suppl. 2):741-750.

Jeacocke, R.E., 1977. Continuous measurement of the pH of beef muscle in intact beef carcasses. J. Food Tech. 12:375-386.

Petracci, M., Rimini, S., Franchini, A., Cavani, C., 2010. Effect of marination on broiler breast meat quality traits. CD of Proc. XIII European Poultry Conference, Tours, France.

Sen, A.R., Naveena, B.M., Muthukumar, M., Babji, Y., Murthy, T.R., 2005. Effect of chilling, polyphosphate and bicarbonate on quality characteristics of broiler breast meat. Brit. Poult. Sci. 46:451-456.

Finito di stampare da

Tipografia Camuna S.p.A. - Breno (Bs)

Centro Stampa di Brescia

nel mese di gennaio 2012

Informazione ecologica:

pubblicazione stampata con assenza di esalazioni alcooliche

Sistema Cesius® brevetto **Philip Borman Italia**

ISBN 978-88-97562-02-3