

Influenza della parziale introduzione di fonti proteiche alternative alla soia su alcuni parametri metabolici e immunologici in suini all'ingrasso



L. GIULIOTTI¹, G. SALVADORI², L. MOSCATI³, M. SENSI³, A. VENTURA², M. NOVELLA BENVENUTI¹, C. RUSSO¹, D. GATTA¹

¹ Dip. Scienze Veterinarie, Università di Pisa

² Veterinario Libero Professionista

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche - Perugia

RIASSUNTO

È stato effettuato uno studio sugli effetti della parziale sostituzione della soia nella dieta di suini pesanti nella fase di ingrasso su alcuni parametri metabolici e immunologici. La prova è stata condotta su 30 femmine omogenee per età e peso, divise in tre gruppi sperimentali: in un gruppo la fonte proteica era rappresentata dalla soia mentre negli altri due questa è stata parzialmente sostituita con il 20% di pisello (*Pisum sativum* L.) e il 18% di favino (*Vicia faba* L. var. minor). Durante la prova, che ha avuto la durata di sei mesi, sono stati effettuati tre prelievi ematici: all'inizio (T0), in una fase intermedia (T1) e prima della macellazione (T2). I parametri analizzati sono stati: ALP, ALT, AST, bilirubina totale, colesterolo, glucosio, NEFA, proteine totali, trigliceridi, GGT, albumina, attività battericida del siero, complemento, lisozima. I risultati hanno evidenziato differenze significative imputabili alla dieta solo per i NEFA ($p < 0,05$), mentre più numerosi sono risultati i parametri influenzati dal periodo di campionamento: colesterolo, trigliceridi, battericidia ($p < 0,05$), ALP, glucosio, lisozima ($p < 0,01$).

Alcuni dei parametri esaminati risultano fuori dal *range* di normalità indipendentemente dalla dieta e dal momento di campionamento.

Dai risultati ottenuti si può osservare che le diete utilizzate non hanno comportato variazioni nel profilo metabolico e immunologico e dei suini nella fase di ingrasso.

PAROLE CHIAVE

Suino pesante, fonti proteiche, parametri metabolici, parametri immunologici.

INTRODUZIONE

Nell'ultimo decennio la farina di soia ha rappresentato la fonte proteica più utilizzata nelle diete dei suini ma attualmente, a causa della diffusione quasi esclusiva sul mercato di soia geneticamente modificata di importazione, a costi spesso molto elevati¹, è emersa l'esigenza di trovare fonti alternative ad essa.

L'uso di alcune leguminose nell'alimentazione degli animali è stato limitato a seguito della presenza di concentrazioni elevate di fattori antinutrizionali, i cui possibili effetti negativi includono la ridotta ingestione degli alimenti (tannini, alcaloidi), la minore digeribilità dei nutrienti (tannini, inibitori della proteasi, lectine) e gli effetti tossici (alcaloidi)² ma attualmente, anche grazie ai notevoli progressi nella selezione delle piante che ha notevolmente ridotto il livello dei metaboliti secondari, il loro impiego non pregiudica lo stato di salute degli animali³.

In un precedente studio⁴ era stato riferito l'effetto dell'utilizzo di diete contenenti favino e pisello in parziale sostituzione della soia sulle performance zootecniche di suini all'

ingrasso, evidenziando che non avevano condizionato in maniera significativa le risposte produttive. Gli incrementi ponderali giornalieri sono risultati g 0,56 - 0,64 - 0,64 e l'indice di conversione degli alimenti è stato 4,18 - 3,83 - 3,77 nei gruppi alimentati rispettivamente con soia e pisello e favino in parziale sostituzione della soia. Differenze non significative sono state registrate anche per lo spessore del lardo dorsale, la lunghezza della groppa e la composizione acida della carne.

La presente ricerca riporta i risultati relativi all'influenza di queste diete su alcuni parametri metabolici e immunologici collegati a condizioni di scarso benessere predisponenti stati patologici^{5,6,7,8}.

Tra i parametri metabolici sono stati valutati ALT, AST, ALP, bilirubina, glucosio, NEFA, trigliceridi, colesterolo, GGT, proteine totali e albumina come indicatori dello stato di salute, soprattutto riguardo alla funzionalità epatica.

Tra i parametri immunologici collegati allo stato di benessere dell'animale⁵, sono stati considerati la titolazione del lisozima sierico per conoscere lo stato di funzionalità del sistema monocitario macrofagico in quanto indice di presenza di stati flogistici, la battericidia sierica, per verificare l'attività del sistema immunitario non specifico e l'analisi del complemento per valutare la competenza immunitaria dell'ospite nei confronti dei patogeni ambientali o delle patologie a sfondo flogistico sub acuto o cronico.

Autore per la corrispondenza:
Lorella Giuliotti (lgiuliot@vet.unipi.it).

MATERIALI E METODI

La prova è stata condotta su 30 femmine (incrocio Pic x Golland) di circa tre mesi di età in un allevamento a ciclo aperto che utilizza metodiche conformi alla Direttiva 2008/120/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini. La prova ha avuto una durata di sei mesi, nel periodo tra Novembre e Maggio. All'arrivo in azienda i soggetti sono stati collocati in gruppi da cinque suini per box per un totale di sei box adiacenti all'interno di uno stesso capannone. I locali, con pavimentazione piena e ventilazione naturale, della superficie di 7,5 mq, disponevano di un abbeveratoio a goccia e di una mangiatoia lineare di tre metri. Dopo una fase di adattamento ambientale della durata di un mese, i suini sono stati identificati mediante marca auricolare, pesati individualmente e suddivisi casualmente in tre gruppi sperimentali di 10 soggetti distribuiti in sei box. Successivamente è stata verificata l'omogeneità statistica dei gruppi in base al peso. Ai tre gruppi sono state assegnate diete isoproteiche ed isoenergetiche, distribuite in due pasti giornalieri sotto forma di sfarinato, che differivano per la fonte proteica:

- Gruppo "Soia": contenente esclusivamente farina di estrazione di soia;
- Gruppo "Pisello": contenente il 20% di farina di pisello (Varietà Cartouche);
- Gruppo "Favino": contenente il 18% di farina di favino (Varietà Scuro di Torrelama).

I campioni di mangime sono stati sottoposti ad analisi chimica seguendo le metodiche suggerite da Martillotti et al.⁹, Van Soest et al.¹⁰, e AOAC¹¹, l'energia digeribile è stata stimata secondo l'equazione proposta da Noblet and Perez¹². La composizione della razione e la relativa analisi chimica sono riportate nelle Tabelle 1, 2.

Ogni razione è stata somministrata inizialmente in quantità di 1,7 kg/capo/die e mensilmente adattata al fabbisogno teorico medio dei soggetti¹³. All'inizio della sperimentazione (T0, età degli animali 120 gg), nella fase intermedia (T1, età degli animali 195 gg) e al termine della stessa (T2, età degli animali 270 gg), sono stati prelevati campioni di sangue dalla vena giugulare a tutti i soggetti. I campioni sono stati centrifugati a 2000 rpm per 15 minuti e il siero è stato congelato a -70°C, in attesa di essere analizzato al termine della prova.

Sono state effettuate le determinazioni di glucosio, NEFA, proteine totali, trigliceridi, colesterolo, ALP, ALT, AST, bilirubina, albumina, GGT, lisozima sierico, attività battericida del siero, titolazione semiquantitativa del complemento.

Glucosio, NEFA, proteine totali, trigliceridi, colesterolo, ALP, ALT, AST, bilirubina, albumina, GGT sono stati eseguiti con analizzatore automatico Hitachi 704 e reagenti Randox (Randox Laboratories, Ireland). La titolazione del lisozima sierico è stata eseguita mettendo a contatto i campioni di siero con una sospensione di *Micrococcus lysodeikticus*, incorporato in un gel di agar, e analizzati secondo la metodica di Osserman et al.¹⁴. L'analisi della battericidia sierica in micro-metodo si è eseguita mettendo in coltura un ceppo di *E. coli* con il siero da saggiare e determinando le variazioni di densità ottica con uno spettrofotometro secondo la metodica di Dorn et al.¹⁵. La titolazione semiquantitativa del complemento emolitico si è basata sulla quantificazione dell'attività litica del siero nei confronti delle emazie di coniglio¹⁶.

I *range* di riferimento utilizzati scaturiscono dai risultati delle analisi di 300 sieri di scrofe e 300 sieri di suini da ingrasso condotte dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche; tali *range* si possano discostare da quelli riportati in letteratura in quanto sono influenzati da numerosi fattori tra cui la razza e la tipologia di allevamento ma risultano più rispondenti al contesto produttivo esaminato.

L'indagine statistica è stata condotta mediante analisi della varianza inserendo nel modello la dieta, il periodo del prelievo e la loro interazione. Per la valutazione del periodo di pre-

Tabella 1 - Composizione percentuale delle tre diete.

| Ingredienti | Dieta | | |
|-----------------------------|--------|---------|--------|
| | Favino | Pisello | Soia |
| Mais | 48,00 | 53,00 | 58,00 |
| Soia f.e. 44% | 6,38 | 8,75 | 15,10 |
| Favino | 18,00 | - - | - - |
| Pisello | - - | 20,00 | - - |
| Orzo | 21,51 | 6,50 | 12,55 |
| Crusca f.t. | 2,50 | 8,00 | 10,00 |
| Strutto | - - | 0,20 | 0,75 |
| Calcio carbonato | 1,30 | 1,30 | 1,30 |
| Fosfato bicalcico | 1,10 | 1,10 | 1,10 |
| Sale | 0,30 | 0,30 | 0,30 |
| Bicarbonato di sodio | 0,20 | 0,20 | 0,20 |
| Premix vitaminico-minerale* | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| Magnesio ossido | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Lisina | 0,05 | - - | - - |
| Metionina | 0,06 | 0,05 | - - |
| | 100,00 | 100,00 | 100,00 |

*Composizione/kg: Fe 90 mg; Zn 80 mg; Cu 15 mg; Mn 25 mg; I 1 mg; Se 0,1 mg; Vit A 10.000 UI; Vit D3 1200 UI; Vit E 80 mg; Vit K 2 mg; Vit B1 1,5 mg; Vit B2 3 mg; Vit B6 4 mg; Vit B12 0,02 mg; Biotina 0,1 mg; Niacina 25 mg; Acido folico 1 mg; Colina 500 mg.

Tabella 2 - Composizione chimica delle tre diete (% S.S).

| Ingredienti | Dieta | | |
|-------------------|--------|---------|-------|
| | Favino | Pisello | Soia |
| Sostanza secca | 91,45 | 90,38 | 90,64 |
| Proteine grezze | 15,58 | 15,26 | 15,19 |
| Lipidi grezzi | 2,84 | 3,35 | 3,15 |
| Fibra grezza | 3,29 | 2,87 | 2,59 |
| Ceneri | 4,17 | 4,32 | 4,21 |
| NDF | 16,05 | 14,34 | 13,82 |
| ADF | 5,18 | 4,31 | 4,48 |
| Cellulosa | 4,78 | 4,10 | 4,15 |
| Emicellulosa | 10,87 | 10,03 | 9,34 |
| ADL | 0,19 | 0,21 | 0,33 |
| E.D (MJ/kg s.s.). | 13,64 | 13,71 | 13,84 |

lievo i dati sono stati analizzati a partire dal T1 e quelli al T0 sono stati utilizzati come covariata. È stato utilizzato il software JMP vers. 5.0 per PC, del S.A.S. Institute¹⁷.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La Tabella 3 riporta i valori medi dei diversi parametri ematici esaminati nei tre gruppi sperimentali e nei tre campionamenti. L'interazione dieta x data di campionamento non è mai risultata significativa.

L'analisi statistica evidenzia differenze significative imputabili alla dieta solo per il parametro NEFA, che presenta valori superiori nel gruppo alimentato con favino; la differente composizione in fattori antinutrizionali delle tre fonti proteiche potrebbe aver determinato questo effetto³. I valori sono risultati sempre fuori dal *range* di normalità tranne che al T0, indicando una possibile alterazione del metabolismo energetico a prescindere dalla dieta.

Numerosi parametri invece sono stati influenzati significativamente dall'epoca del prelievo.

Differenze altamente significative ($p < 0,01$) si riscontrano a carico del glucosio e dell'ALP, con la differenza che per il secondo parametro i valori sono sempre compresi nel *range* di riferimento mentre il glucosio ha presentato una tendenza a rientrare nella normalità con il protrarsi dello studio. Tali valori sono simili a quelli riportati da Trombetta et al.⁶ in una prova che prevedeva la parziale sostituzione della soia con pannello di mais e cicerchia.

I valori di colesterolo risultano influenzati ($p < 0,05$) dal momento del prelievo e si discostano dall'intervallo di riferimento in tutto il corso della prova. Per quanto riguarda i trigliceridi, il loro livello tende ad innalzarsi con il progredire della prova ($p < 0,05$) e risultano fuori dal *range* di riferimento per tutto il periodo sperimentale.

Con l'eccezione del prelievo al T0 (36,87U/L), tutti i valori di

AST si presentano fuori dal *range* di riferimento e paragonabili a quelli riportati da Trombetta et al.⁶.

Anche il valore dell'albumina risulta compreso nell'intervallo di riferimento solo al T0 (31,30 g/L), per poi superare di poco il limite fisiologico superiore.

Per quanto riguarda i parametri immunologici, l'attività battericida del siero ($p < 0,05$) e il lisozima ($p < 0,01$) risultano influenzati dall'epoca del prelievo. L'attività battericida del siero dipende dalla presenza nel siero di anticorpi naturali, cioè diretti contro le più comuni componenti della flora batterica ambientale, e da fattori del complemento. È un importante parametro per valutare la funzionalità del sistema immunitario non specifico ed è il primo dei parametri d'immunità innata ad alterarsi nel suino¹⁸.

I valori relativi all'attività battericida del siero risultano sempre al di sotto dei *range* di normalità, suggerendo la presenza di fattori stressanti, con conseguente impegno del sistema immunitario aspecifico⁷. Tuttavia l'attività battericida tende ad aumentare nel tempo suggerendo che gli animali, pur in presenza di fattori ambientali stressanti, riescono nel tempo a iniziare a costruire una risposta adeguata.

La Titolazione del lisozima sierico permette di conoscere lo stato di funzionalità del sistema monocitario-macrofagico ed è indice di presenza di stati flogistici: questo parametro aumenta tanto da essere superiore ai *range* di riferimento quando insorgono stati infiammatori.

Il lisozima, in questa prova, risulta decisamente superiore al valore massimo dell'intervallo di normalità al T0 (6,77 µg/ml), rientrando solo successivamente nel *range*.

I valori relativi al complemento presentano un andamento opposto: da una situazione iniziale di normalità (99,03 CH50) si abbassano drasticamente nel corso della prova, ciò è probabilmente dovuto al fatto che il complemento, in conseguenza di eventi flogistici, è l'ultimo dei parametri ad alterarsi nel suino¹⁸. La diminuzione contemporanea dei livelli di complemento e di attività battericida del siero al di sotto dei valori

Tabella 3 - Andamento dei parametri ematici nei tre gruppi sperimentali e nei tre campionamenti.

| | Unità di misura | Dieta | | | Periodo di prelievo | | | Coefficiente di regressione b | MSE | Range di normalità |
|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------|---------------------|-------------|-------------|----------------------------------|-------|--------------------|
| | | Favino media | Pisello media | Soia media | T0 media | T1 media | T2 media | | | |
| ALP | U/L | 279,02 | 289,22 | 286,70 | 220,50 | 314,84 A | 255,12 B | -5,95 | 69,69 | 100-400 |
| ALT | U/L | 33,37 | 31,26 | 34,69 | 35,38 | 32,59 | 33,62 | 0,26 | 6,88 | 20-60 |
| AST | U/L | 26,58↓ | 22,71↓ | 25,98↓ | 36,87 | 24,26↓ | 25,92↓ | 1,49 | 15,38 | 36-80 |
| Bilirubina totale | µmol/L | 1,87 | 1,17 | 1,83 | 2,06 | 1,62 | 1,63 | 0,25 | 1,64 | 0-17,1 |
| Colesterolo | Mmoli/L | 2,78↑ | 2,68↑ | 2,73↑ | 2,46↑ | 2,84↑ a | 2,62↑ b | 0,05 | 0,42 | 0,9-1,4 |
| Glucosio | Mmoli/L | 6,46↑ | 6,21↑ | 7,55↑ | 7,04↑ | 8,56↑ A | 4,92 B | -0,28 | 1,85 | 2,9-5,9 |
| NEFA | Mmoli/L | 0,45↑ a | 0,30↑ b | 0,35↑ b | 0,05 | 0,38↑ | 0,35↑ | 0,08** | 0,15 | 0-0,1 |
| Proteine totali | g/L | 73,64 | 77,15 | 77,49 | 68,95 | 77,98 | 74,21 | -2,45 | 8,55 | 65-90 |
| Trigliceridi | Mmoli/L | 0,76 | 0,74 | 0,70 | 0,54 | 0,68 a | 0,79 b | 0,02 | 0,18 | 0-0,3 |
| GGT | U/L | 27,10 | 26,40 | 30,24 | 27,40 | 27,18 | 28,65 | -0,81 | 6,26 | 10-60 |
| Albumina | g/L | 40,64↑ | 42,44↑ | 40,91↑ | 31,30 | 41,59↑ | 41,07↑ | -0,69 | 3,67 | 30-40 |
| Battericidia | % | 27,73↓ | 25,52↓ | 26,38↓ | 19,15↓ | 23,47↓a | 29,62↓b | 0,35* | 11,59 | >40 |
| Complemento | CH50 | 52,59↓ | 52,78↓ | 53,43↓ | 99,03 | 52,27↓ | 53,60↓ | -0,34 | 9,00 | >80 |
| Lisozima | µg/ml | 1,79 | 1,67 | 1,78 | 6,77↑ | 1,46A | 2,03 B | 0,04 | 0,60 | 1-3 |

a, b, *, P<0,05; A, B, **, P<0,01; ↑: parametro al di sopra del *range* di riferimento; ↓: parametro al di sotto del *range* di riferimento.

considerati di riferimento è un fenomeno ricorrente negli ibridi commerciali, in quanto la selezione a favore degli aspetti produttivi, indebolisce il sistema immunitario, favorendo l'insorgenza di patologie condizionate⁷.

CONCLUSIONI

Alla luce delle situazioni che sono state evidenziate, la fonte proteica non ha influenzato significativamente la quasi totalità dei parametri ematici esaminati. D'altra parte, il favino ed il pisello utilizzati per suini all'ingrasso in parziale sostituzione della soia non avevano condizionato in maniera significativa neanche le performance zootecniche, la composizione chimica e il profilo acidico della carne.

Alcuni dei parametri esaminati, sia metabolici che immunologici, risultano fuori dal *range* di normalità in tutti i gruppi sperimentali, andando ad indicare l'influenza di situazioni ambientali non dipendenti dalla dieta, che hanno interessato soprattutto il metabolismo energetico.

Anche in considerazione dei risultati ottenuti dal presente studio, le due leguminose possono essere utilizzate come possibili integrazioni alla farina d'estrazione di soia.

■ Influence of partial introduction of protein sources alternative to soybean on some metabolic and immunological parameters in fattening pigs

SUMMARY

Pea (*Pisum sativum* L.) and Faba bean (*Vicia faba* L. var. minor) are valuable sources of protein and energy for monogastric animals, traditionally cultivated in the Mediterranean area. They can partially or even totally replace soybean meal, that is very expensive and often derived from GM plants.

The aim of this study was to evaluate some immunological and metabolical parameters in fattening pigs fed diets containing pea or faba bean meal as partial substitution of soybean.

The trial was carried out using 30 post-weaned female piglets divided into three dietary treatments formulated to be isoengetic and isoproteic; one group received only soybean as protein source while the others received 20% of pea and 18% of faba bean as partial substitution of soybean. At the beginning (T0), in the intermediate stage (T1) and at the end of the trial (T2), blood samples were taken from the tail vein. The following parameters were investigated in serum: ALP, ALT, AST, total bilirubin, cholesterol, glucose, NEFA, total protein, triglycerides, GGT, albumin, bactericidal activity, haemolytic complement, lysozyme. Statistical analysis was performed by ANOVA including in the model the diet, the date of sampling and their interaction; the values at T0 were used as covariate.

The different diets affected only NEFA while the date of sampling affected several parameters: cholesterol, triglycerides, bactericidal activity ($p < 0.05$) and ALP, glucose and lysozyme ($p < 0.01$).

Some parameters resulted out of the normality range (AST, cholesterol, NEFA, triglycerides, albumin, bactericidal activity, haemolytic complement) independently from the diet and from the date of sampling with the exception of glucose, which in the second sample, returned in the normal range. From these results it can be observed that the tested diets did not result in changes in metabolic and immunological profile of pigs during fattening, then faba beans and peas could partially substitute soybean in fattening pigs diets.

KEY WORDS

Heavy pig, protein sources, metabolic parameter, immunological parameter.

Bibliografia

1. Jezierny D., Mosenthin R., Bauer E. (2010) The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review. *Anim Feed Sci Tech*, 157: 111-128.
2. Huisman, J., Tolman, G.H. (2001) Antinutritional factors in the plant proteins of diets for non-ruminants. In: Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. (Eds), *Recent Developments in Pig Nutrition* 3, 261-322, Nottingham University Press, Nottingham, UK.
3. Gatta D., Russo C., Giuliotti L., Mannari C., Picciarelli P., Lombardi L., Giovannini L., Ceccarelli N., Mariotti L. (2013) Influence of partial replacement of soya bean meal by faba beans or peas in heavy pigs diet on meat quality, residual anti-nutritional factors and phytoestrogen content, *Arch Anim Nutr*, 67: 235-247.
4. Giuliotti L., Salvadori G., Benvenuti M.N., Russo C., Ventura A., Gatta D. (2010) Impiego di fonti proteiche alternative alla soia nell'alimentazione del suino pesante. *Atti XXXVI Meeting Annuale SIPAS, Montichiari (BS)*, 25-26 marzo, 329-336.
5. Moscati L., Stelletta C., Sensi M., Sonaglia L., Battistacci L. (2003) Studio di alcuni parametri immunologici per la valutazione dello stato di benessere nell'allevamento del suino all'ingrasso. *Atti V Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.*, Pisa 20- 21 novembre, 103-104.
6. Trombetta M.F. (2004) Andamento del profilo metabolico in suini alimentati con diete diverse. *Large Anim Rev*, 10(2): 23-26.
7. Moscati L., Sensi M., Battistacci L., Archetti I.L., Amadori M. (2011) Evaluation of Innate Immunity in Pigs Under Field Conditions. *Vet Scan On Line Veterinary Journal*, 6 (2), Article 90.
8. Moscati L., Perugini G., Sensi M., Battistacci L. (2010) Valutazione di parametri di immunità innata in due allevamenti suini. *Webzine Sanità Pubblica Veterinaria*, 63: 12-14.
9. Martillotti F., Antongiovanni M., Rizzi L., Santi E., Bittante G. (1997) Metodi di analisi per gli alimenti d'impiego zootecnico. *Quaderni metodologici n. 8*, CNR-IPRA, Roma.
10. Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. (1991) Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci*, 74: 3583-3597.
11. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (1990) *Official Methods of analysis. Meat and meat products*. 39 (15th ed.), Washington, DC.
12. Noblet J., Perez J.M. (1993) Prediction of digestibility of nutrients and energy values of pig diets from chemical analysis. *J Anim Sci*, 71(12): 3389-3398.
13. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). (1989) *L'alimentation des animaux monogastriques: porc, lapin, volailles*. 2nd ed. Paris (France).
14. Osserman E.F., Lawlor D.P. (1966) Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *J Exp Med.*, 124: 921-952.
15. Dorn W., Mehl G., Clem CHR. (1980) Untersuchungen zur serumbakterizidie beim Kalb. *Arch Exper Vet Med*, 34: 635-650.
16. Barta V., Barta O. (1993) Testing of Hemolytic Complement and its components. In: Barta O. (ed.) *Vet. Cl. Imm. Lab, Bar-Lab, Blacksburg, USA*.
17. JMP (2002) *J.M.P. User's Guide ver. 5.0*, S.A.S. Institute Inc. Ed. Cary (NC), USA.
18. Amadori M., Archetti I.L., Frasnelli M., Bagni M., Olzi E., Caronna G., Lanteri M. (1997) An immunological approach to the evaluation of welfare in Holstein friesian cattle. *Zentralbl Veterinarmed B*, 44 (6): 321-327.