

LA VALUTAZIONE DEL BENESSERE
NELLA SPECIE BOVINA

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 Conigliocultura: 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 chetotica 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

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECHNICHE
- BRESCIA -

**LA VALUTAZIONE DEL BENESSERE
NELLA SPECIE BOVINA**

A cura di Massimo Amadori, Ivonne Laura Archetti

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

INDICE

M. AMADORI <i>Il benessere animale: compiti e prospettive</i>	9
M. AMADORI, I.L. ARCHETTI, M.M. MONDELLI, M. FAZIA <i>La valutazione del benessere animale</i>	13
VERGA M., NORMANDO S., CONSONNI S., CANALI E. <i>Indicatori integrati di benessere nel vitello a carne bianca</i>	21
GIULIO COZZI, FLAVIANA GOTTARDO, SONIA FIORELLA PRECISO, IGINO ANDRIGHETTO <i>Significato dei parametri zootecnici quali indicatori di benessere nei bovini da carne</i>	37
SCANZIANI E., LUINI M. <i>Ruolo dei rilievi ispettivi al macello nella valutazione del benessere nella specie bovina</i>	45
LE ANALISI DI LABORATORIO	
ARCHETTI I.L., RAVAROTTO L. <i>Prelievo e processazione dei campioni di sangue</i>	49
AMADORI M., ARCHETTI I.L. <i>Immunologia clinica</i>	53
<i>Titolazione semiquantitativa del complemento emolitico nel siero bovino</i>	57
<i>Determinazione della battericidia sierica con test in micrometodo</i>	61
<i>Determinazione della capacità di blastizzazione linfocitaria</i>	65
<i>Dosaggio dell'aptoglobina nel sangue bovino</i>	69
ARCHETTI I.L., RAVAROTTO L. <i>Elettroforesi delle sieroproteine bovine</i>	73
ARCHETTI I.L., RAVAROTTO L. <i>Esame emocromocitometrico e formula leucocitaria mediante strumento CELL-DYN 3500®</i>	77

G. BRAMBILLA, A. BALLERINI, C. CIVITAREALE, M. FIORI La misurazione dello stress ossidativo nel bovino da carne ai fini della valutazione del benessere	85
<i>Procedure operative per la misurazione di ROMS nel siero di bovini</i>	89
P. BERTOLIN, M. BORTOLUZZI, L. RAVAROTTO Analisi dei parametri chimico-clinici impiegati quali indicatori di benessere animale	95
RINGRAZIAMENTI	109

PRESENTAZIONE

La Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche con grande attenzione ha sempre seguito lo sviluppo dei problemi di tutte le specie animali siano esse da reddito come d'affezione e, per l'evolversi delle conoscenze, ha ritenuto opportuno pubblicare, in questo ultimo numero dei suoi editoriali, un "quaderno" sulla valutazione del benessere nella specie bovina.

Massimo Amadori e Ivonne Laura Archetti hanno curato, con competenza, la composizione del volume riportando, nella prima parte dello stesso, i principi fondamentali nella valutazione del benessere animale, gli indicatori integrati di benessere nel vitello, il significato dei parametri zootecnici quali indicatori del benessere nei bovini da carne e, in fine, il ruolo dei rilievi ispettivi al macello nella valutazione del benessere in questa specie animale.

A questa prima parte segue il capitolo inerente le analisi di laboratorio che è quanto mai interessante ed affascinante poiché mette in evidenza, se pure ve ne fosse bisogno, l'importanza del laboratorio nello studio di questa materia relativamente nuova. A quanti operano nei laboratori viene data la possibilità di avere una utile guida per conoscere moderne analisi atte a definire i livelli di benessere nelle specie di interesse zootecnico.

A chi opera nel campo dell'allevamento degli animali da reddito non può sicuramente sfuggire come l'applicazione delle norme più elementari inerenti al benessere animale abbia portato a risultati notevolmente positivi sia nell'evitare, prevenire e combattere le patologie infettive sia per quanto concerne gli indici di trasformazione e, di conseguenza, la produzione di un maggior reddito di allevamento.

Il Medico Veterinario ha il dovere di studiare il rapporto animale/ambiente in quanto, al di là dell'allevamento inteso come reddito, ha il compito di far rispettare quelle condizioni di civiltà di allevamento per il benessere della vita degli animali che tanto danno senza mai nulla chiedere in cambio. Ecco che l'opera "*La valutazione del benessere nella specie bovina*", tanto ben curata da Massimo Amadori e Ivonne Laura Archetti, porta un notevole contributo a quanti, con gli animali, professionalmente lavorano.

Inoltre "*La valutazione del benessere nella specie bovina*" testimonia e può dare una chiara visione di quale contributo possa dare attualmente la veterinaria non solo come scienza ma, particolarmente, anche come sviluppo di civiltà nel riconoscere quanto gli animali debbano essere rispettati ed amati nel loro, purtroppo, breve periodo di vita.

Il Direttore Generale
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
Lombardia e Emilia-Romagna

Prof. Ezio Lodetti

IL BENESSERE ANIMALE: COMPITI E PROSPETTIVE

Reparto Benessere Animale e Immunoprofilassi, IZSLER, Brescia

Il settore del benessere animale è stato oggetto di ripetuti interventi del legislatore. Per quanto concerne gli animali di interesse zootecnico, la Unione Europea ha varato una serie di norme per l'allevamento degli animali (Direttiva 98/58/CE) ed in particolare: del vitello (Direttiva 91/629/CEE, Direttiva 97/2/CE), del suino (Direttiva 91/630/CEE, Direttiva 2001/88/CE, Direttiva 2001/93/CE), della gallina ovaioia (Direttiva 88/166/CEE, Direttiva 1999/74/CE) e per il trasporto (Direttiva 91/628/CEE, DIR 95/29/CEE, Regolamento CEE n. 1255/97) e la macellazione degli animali (Direttiva 74/577/CEE, Direttiva 93/119/CEE); tali direttive, già recepite o in via di recepimento dal Legislatore Nazionale, mirano ad introdurre misure minime di protezione delle specie animali sopracitate a garanzia di livelli accettabili di benessere nelle diverse fasi dei cicli zootecnici. Che cosa si intende in realtà con il termine "benessere"? Si intende una condizione psicofisica dinamica dell'individuo per quanto concerne i suoi tentativi di adattarsi all'ambiente. In questo senso, il benessere è un concetto quantitativo, non qualitativo: vi sono cioè livelli diversi di benessere animale. In questo senso il concetto di stress comprende tutte le turbative ambientali che sovraccaricano i sistemi di controllo e di regolazione dell'individuo e ne riducono (o sembrano ridurne) l'efficienza. In tale contesto sorge ovviamente il problema di come accertare in forma obiettiva le condizioni di benessere e di come accertare le sue variazioni connesse alle condizioni ambientali. Vi è in sostanza il rischio di avere a disposizione una serie di norme legislative, non adeguatamente supportate da strumenti di lavoro adeguati allo scopo. E come se avessimo in pratica un Piano Nazionale Tubercolosi senza il test tubercolinico!

Va sottolineato altresì che la definizione di parametri obiettivamente di benessere degli animali di interesse zootecnico e di relative linee-guida rappresenta un obiettivo fondamentale della Sanità Pubblica Veterinaria; in particolare, tali parametri possono rappresentare uno strumento operativo fondamentale per l'area C, di cui all'art. 7 del decreto legislativo n. 502/1992. Tale area dei Servizi Veterinari deve occuparsi com'è noto anche del controllo sul benessere degli animali da reddito, da affezione e di quelli destinati alla sperimentazione animale.

In questo senso, parametri di valutazione validati e relative linee-guida interpretative consentiranno di snellire e facilitare il lavoro dei Colleghi di tale area, fornendo loro un indispensabile supporto scientifico nella adozione dei provvedimenti di loro competenza. Inoltre, l'accertamento puntuale e tempestivo dei livelli di benessere animale è funzionale ad una fondamentale attività di certificazione delle filiere alimentari, in linea con le attuali direttive della UE in campo zootecnico, soprattutto sulla qualità delle produzioni, intesa come qualità totale del processo produttivo, e sulla valorizzazione delle produzioni locali tipiche di qualità. L'accertamento di buone condizioni di benessere nel corso dei cicli zootecnici rappresenta infine una delle massime garanzie per il consumatore anche rispetto ai possibili trattamenti illegali degli animali, che lasciano spesso tracce durevoli su molteplici parametri di omeostasi metabolica e comportamentale, espressione dei livelli di benessere animale. Sulla base degli elementi sopra esposti, questo Quaderno della Fondazione Iniziative vuole essere innanzitutto uno strumento di lavoro agile e pratico per gli operatori del settore. Il volumetto è fondato innanzitutto sull'esperienza accumulata in due anni di lavoro da alcuni Istituti Zooprofilattici Sperimentali, dal Laboratorio di Medicina Veterinaria

dell'ISTISAN e dall' Istituto di Zootechnica della Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano nell'ambito del progetto di ricerca corrente del Ministero della Salute 013/98 "Valutazione dello stato di benessere in animali allevati intensivamente mediante analisi di indicatori comportamentali, fisiologici e produttivi. Specie bovina". Il Quaderno vuole in particolare mettere in risalto alcuni approcci sperimentali multi-disciplinari che si sono rilevati utili a definire stati obiettivamente carente benessere in diverse categorie zootecniche della specie bovina.

Va sottolineato che la definizione di parametri precisi e obiettivamente di benessere animale potrebbe consentire al nostro Paese di presentarsi più agguerrito nei consessi internazionali dove si discutono le condizioni degli allevamenti a carattere intensivo ed estensivo. Si rammenti a tale proposito che tecniche di allevamento "dolci" sono già state introdotte in alcuni Paesi del Nord Europa e che esse tenderanno a costituire il quadro di riferimento per l'evoluzione delle aziende zootecniche. In questo senso, le tecniche di allevamento dovranno considerare come irrinunciabili le condizioni che garantiscano benessere animale, rispetto delle esigenze etologiche e centralità dell'igiene zootecnica, nonché nuovi approcci sia di gestione degli animali che immunologici e farmacologici per la prevenzione e la terapia.

La problematica del benessere animale richiede l'interessamento dei veterinari aziendali e del Servizio Veterinario delle ASL. Al di là della collocazione lavorativa, il medico veterinario deve porre al centro della propria professionalità il rapporto animali/ambiente, che pure deve essere adeguatamente considerato nella progettazione degli insediamenti zootecnici. Tale rapporto può essere analizzato con un approccio combinato, multidisciplinare, basato su competenze di clinica, etologia, immunologia, immuno-biochimica. Sulla base di queste analisi, il veterinario deve proporre nella realtà dell'allevamento intensivo idonei interventi di igiene zootecnica e/o di immunomodulazione mirata, anche e soprattutto al fine di prevenire risposte di stress cronico che possono sfociare in patologie condizionate. Questo approccio nuovo può contribuire positivamente all'immagine della professione veterinaria e alla ricostruzione di un rapporto di fiducia con larghi strati di consumatori.

In senso prospettico, sarà di vitale importanza verificare che gli animali siano in grado di adattarsi progressivamente all'ambiente loro destinato. A seguito, ad esempio, di uno stress da trasporto e da formazione dei gruppi, l'adattamento si accompagna ad un progressivo ripristino di fondamentali condizioni di normalità dell'etogramma e di regolazione metabolica, anche a livello dei parametri correlati alla competenza immunitaria nei confronti dei patogeni ambientali. Tale competenza è un indice preciso del livello di benessere animale. In situazioni "problema", l'uso massiccio di farmaci, antibiotici e chemioterapici in particolare, risulta la via più semplice per proteggere gli animali. E' necessario invece garantire una migliore condizione di benessere animale in senso preventivo, al fine di mantenere in piena efficienza la competenza immunitaria dei soggetti allevati. Il fulcro della questione è rappresentato dalla tipologia degli insediamenti zootecnici, nonché dalla spinta produttiva a cui sono sottoposti gli animali. L'uso eccessivo di chemio-antibiotici porta infatti alla selezione di ceppi resistenti, alla modificazione della flora intestinale, all'accumulo ambientale (eliminazione tramite feci ed urine), a forme tossiche o allergiche e per ultimo, ma non meno importante, al rischio di residui nelle carni. Dei tre motivi fondamentali per l'utilizzo di antibiotici (curativo, preventivo e come fattore auxinico), solo quello terapeutico è accettabile, mentre dovremo, nel prossimo futuro, rifiutarne l'uso profilattico e come stimolatori di crescita.

La valutazione su basi obiettive del Benessere Animale è pertanto funzionale alla professione veterinaria in campi decisivi e strategici, nei quali il medico veterinario deve necessariamente assumere un ruolo propositivo e propulsivo per la risoluzione dei problemi e non appiattirsi su mere funzioni di verifica e controllo. Da una visione bucolica del Benessere

Animale si deve pertanto passare ad una interazione fattiva con le imprese zootecniche, in cui tale problematica possa essere percepita come stimolo al miglioramento quali-quantitativo delle produzioni e alla loro riqualificazione. La vera sfida per il futuro è pertanto la definizione di un equilibrio dinamico, fondato su rigorose basi scientifiche, che contemperi le legittime preoccupazioni etiche del legislatore e dell'opinione pubblica con le aspettative di reddito e di sviluppo delle imprese zootecniche.

M. AMADORI, I.L. ARCHETTI, M. M. MONDELLI, M. FAZIA

LA VALUTAZIONE DEL BENESSERE ANIMALE

Reparto Benessere Animale e Immunoprofilassi, IZSLER, Brescia

Il concetto di benessere animale è stato inteso diversamente dai ricercatori, che hanno sottolineato con pesi e accenti diversi le componenti fisiologiche e psicologiche di tale problematica. Ai fini della nostra trattazione è possibile accettare la definizione di Broom e Johnson (3), secondo la quale il benessere animale è “Lo stato di un individuo per quanto concerne i suoi tentativi di adattarsi all’ambiente”. Da questa definizione scaturisce che il benessere è una variabile quantitativa, non qualitativa, che esistono cioè diversi livelli di benessere in rapporto alle condizioni ambientali date. In questo ambito può essere meglio compreso il concetto di stress come “Effetto ambientale su un individuo che sovraccarica i suoi sistemi di controllo e regolazione e riduce o sembra ridurre la sua efficienza. La riduzione di efficienza può essere compensata o portare a conseguenze dannose per l’individuo” (3).

Come agisce in realtà uno stimolo stressante potenzialmente pericoloso? Secondo lo schema di Moberg (11), uno stimolo stressante può essere percepito come minaccia alla omeostasi metabolica; a ciò consegue l’organizzazione di una difesa biologica, che innesca una risposta biologica a livello neuro-endocrino e comportamentale; a tale risposta biologica seguono distinti cambiamenti di funzioni biologiche in diversi organi ed apparati; se non adeguatamente compensati, tali cambiamenti possono portare a stati pre-patologici ed infine a patologie clinicamente conclamate.

Da tali considerazioni consegue che esistono due fondamentali strategie di valutazione del benessere animale:

- La valutazione della risposta biologica (neuro-endocrina e comportamentale).
- La valutazione dei cambiamenti di funzioni biologiche.

A tali fondamentali strategie si possono affiancare utilmente come illustrato altrove valutazioni epidemiologiche e bio-statistiche su diverse fonti di dati clinici, anatomo-patologici, riproduttivi e di efficienza zootecnica. Entrambe le strategie sopra delineate sono valide e indubbiamente complementari tra loro. Nel nostro laboratorio è stata adottata la strategia di sviluppare saggi di laboratorio atti a determinare i cambiamenti di funzioni biologiche. Per quanto concerne la scelta dei saggi, questa può essere impostata sulla base della situazione stressante evidenziata o presumibile nelle condizioni di campo.

Possiamo cioè distinguere:

Saggi atti ad evidenziare situazioni stressanti acute, applicati a ridosso di tali eventi (risposte a breve termine di tipo comportamentale, di alterazione di parametri fisiologici, di alterazione delle carni a ridosso della macellazione). Misurazioni del battito cardiaco, frequenza respiratoria, ormoni, enzimi, prodotti metabolici, alterazione PSE delle carni possono fungere da esempio.

Saggi atti ad evidenziare situazioni stressanti croniche, correlate alla tipologia e all’organizzazione dei cicli zootecnici. Oltre a valutazioni bio-statistiche sulle funzioni riproduttive, sulla aspettativa di vita, sugli incrementi ponderali, a osservazioni di vizi comportamentali correlati agli stress cronici, sono estremamente utili in questo ambito saggi di laboratorio atti a misurare parametri fisiologici; tra questi, i parametri ormonali ed immunitari rivestono un ruolo indubbiamente centrale in questo tipo di valutazione.

In particolare, l’approccio immunologico è fondamentalmente “robusto”:

- Non risente in linea generale delle turbative legate alle manualità di prelievo dei campio-

ni biologici, al contrario delle risposte ormonali.

- Si basa su parametri obiettivabili e non su giudizi soggettivi, come i parametri comportamentali.
- Non richiede tempi prolungati di osservazione come i parametri comportamentali.
- Non richiede l'impiego prolungato di personale specializzato.
- Fornisce dati predittivi sulla possibile evoluzione di condizioni di scarso benessere verso patologie clinicamente conclamate.

Il sistema immunitario è in grado di fornirci informazioni estremamente utili in quanto presenta elementi di strettissima connessione anatomica e funzionale con il sistema nervoso centrale e periferico; in particolare, le cellule nervose presentano recettori per fondamentali citochine di tipo regolatorio del sistema immunitario; queste stesse citochine possono inoltre essere secrete da cellule nervose, determinando una condizione di dialogo reciproco tra cellule nervose, linfoidi e mieloidi, di "cross-talk" secondo gli autori Anglo-sassoni, all'interno di un sistema globale di rilevazione e di risposta dell'organismo animale. È opportuno precisare che i neuroni non possiedono recettori per virus e batteri; tuttavia, la presenza di questi microrganismi provoca profondi cambiamenti nel sistema neuroendocrino ed un "comportamento da malattia", che include febbre, anoressia e letargia, indotte da citochine pro-infiammatorie ad azione regolatoria sul sistema immunitario, come IL-1 β , IL-6 e TNF α (9).

Quali componenti del sistema immunitario è opportuno considerare per apprezzare lo sforzo di adeguamento omeostatico degli animali? È opportuno ricordare lo schema di Janeway (8), secondo il quale la risposta immunitaria a carattere immediato (< 4 ore) e precoce (4 -96 ore) è mediata dal sistema immunitario innato, non adattativo, che condiziona in forma primaria l'interazione con i più comuni patogeni ambientali. Lo stress è in grado di deprimere tali risposte di fase immediata e precoce, costringendo l'individuo a ricorrere massicciamente a risposte più tardive (>96 ore) di tipo adattativo, specifiche (anticorpi e linfociti T citotossici), nell'ambito di quadri anatomico-clinici indubbiamente più gravi. In pratica, da un disturbo emotivo si passa ad uno squilibrio neuroendocrino, cui possono conseguire alterazioni fisio-patologiche (3). Tra queste, vi è anche una riduzione della attività immunitaria umorale e cellulo-mediata, alla quale è possibile ricondurre una aumentata sensibilità ad agenti di malattie infettive; tale assunto è stato validato in modelli di infezione sperimentale di animali da laboratorio con diversi virus (4, 5, 6, 10). Nell'ambito degli animali di interesse zootecnico, alcune fasi dei cicli zootecnici come lo svezzamento, i cambi di alimentazione, il trasporto e la formazione dei gruppi possono costituire l'equivalente delle situazioni stressanti artificiali applicate agli animali da laboratorio. In pratica, in presenza di turbe notevoli della omeostasi metabolica, o si produce un ripristino funzionale o si giunge ad episodi di malattia. La malattia stessa può essere considerata come il massimo degli stress possibili, ovvero il "disease stress" (2). In tale ambito, la tipica risposta dell'individuo caratterizzata da secrezione sequenziale di TNF α , cortisolo, IL-6 e da incremento dei livelli di urea può essere riprodotta dalla semplice inoculazione di lipopolisaccaridi di *E. coli*, con i caratteristici riscontri di lipolisi, proteolisi, anoressia, febbre, letargia (2). Il "disease stress" è caratterizzato inoltre da una perdita notevole della conversione della razione alimentare, non compensabile con l'aumento del contenuto energetico (2); in questo senso, la reazione di anoressia è una reazione di difesa dell'organismo animale, correlabile positivamente alla probabilità di sopravvivenza (9).

Dalle considerazioni sopra enunciate risulta in sostanza che una forte turbativa della omeostasi metabolica derivante da mancato adattamento agli stimoli ambientali può comportare l'emergere di episodi di malattia condizionata, se tale turbativa non è compensata in tempo utile. Quale strategia adottare allora di fronte a questo scenario di fondo? Sulla base

di una esperienza consolidata in 8 anni di studi e ricerche, riteniamo che sia utile applicare una serie di esami di laboratorio a sfondo immunologico, ematologico e chimico-clinico, atti a definire l'entità dello sforzo di adattamento ambientale degli animali e le alterazioni correlate a tale sforzo, ovvero i cambiamenti di funzioni biologiche più sopra ricordate. Ricordiamo a tale proposito che alcuni di questi saggi di laboratorio sono già stati validati nella specie bovina (1), dimostrando fra l'altro un notevole potere predittivo sull'emergere di patologie condizionate (1); questi ed altri saggi sono stati ulteriormente validati in uno studio multicentrico biennale di ricerca corrente del Ministero della Salute (progetto 013/98). Questi test, che riteniamo sufficiente "robusti", vengono descritti in altri capitoli di questo libro, insieme con i valori di riferimento normali per le diverse categorie zootecniche. E' utile qui illustrare i parametri interpretativi di questi test, che possano opportunamente guidare gli operatori del settore nel loro utilizzo.

E' scorretto porre l'attenzione su singole alterazioni obiettivabili, disgiunte dal contesto ambientale degli animali e, soprattutto, dalla fase del ciclo zootecnico. In questo senso, quattro sono i criteri che devono indirizzare il giudizio degli operatori:

1. La cinetica temporale delle alterazioni evidenziate.
2. La prevalenza di queste alterazioni nel gruppo in esame.
3. La concomitanza di più alterazioni correlabili negli stessi soggetti.
4. L'associazione di alcune alterazioni con altre a significato prognostico decisamente negativo (vedi risposta di fase acuta del fegato).

Il concetto di cinetica temporale richiede alcune precisazioni. E' possibile infatti che gli animali subiscano nel corso del ciclo zootecnico alcune "crisi", derivanti dal repentino cambiamento di condizioni ambientali: lo svezzamento, il trasporto, i cambi di alimentazione e la formazione dei gruppi rappresentano gli esempi più tipici. Presupponendo l'insorgenza di tali "crisi" associabili a fasi particolari dei cicli zootecnici, è però importante verificare il "coping" ambientale degli animali nelle fasi successive all'evento stressante considerato. E' normale ad esempio che siano presenti alterazioni a ridosso di uno stress da trasporto prolungato; in questo senso è compito del legislatore normare in forma precisa tale pratica zootecnica per definirne i limiti di accettabilità e impedire che le conseguenze siano oltremodo gravi. Dal punto di vista del benessere animale è assai importante verificare invece il grado di ripristino dei valori normali entro 10 – 15 giorni dal ristallo degli animali, correlato al grado di igiene zootecnica dei ricoveri e alle pratiche di conduzione aziendale; la persistenza di alterazioni a due settimane dal ristallo può essere correlata all'insorgenza di patologie condizionate o alla riduzione dell'accrescimento ponderale (1).

L'analisi può consentire all'operatore di valutare il grado di benessere animale sulla base dell'entità dello sforzo di adattamento e, naturalmente, dell'efficacia di tale sforzo. Pertanto, il livello di benessere sarà ridotto se l'individuo sarà costretto ad uno sforzo notevole di adattamento all'ambiente, prolungato nel tempo, evidenziato dai cambiamenti di funzioni biologiche; un ulteriore e decisivo peggioramento della situazione deriverà da una incapacità dell'individuo di montare una adeguata risposta adattativa alle condizioni ambientali. A tale proposito si tenga anche presente che esiste una notevole variabilità su base genetica della capacità di adattamento ambientale: a parità di stimolo esterno alcuni individui reagiranno con modesti aggiustamenti omeostatici, altri saranno costretti a risposte compensative molto più elevate, altri ancora saranno incapaci di allestire una adeguata risposta allo stimolo dell'ambiente.

Nell'ambito di studi di campo a carattere prospettico, abbiamo cercato di definire il quadro di benessere animale risultante da tipiche situazioni di allevamento della specie bovina, nelle categorie vitelli e bovine da latte.

VITELLI DA RIPRODUZIONE

Nell'ambito di uno studio a carattere prospettico di coorte su vitelli di razza Frisona inviati ad un Centro Genetico (1) abbiamo riscontrato che molti parametri immunologici ed ematologici risultavano alterati a ridosso dello stress da trasporto; in seguito, in relazione alle buone condizioni ambientali, si assisteva ad un generale ripristino dei valori normali nelle due settimane successive. Vi era inoltre una elevata correlazione tra persistenza di alterazioni in singoli soggetti ed insorgenza di patologie condizionate, gastro-enteriche e respiratorie. I saggi con maggiore significato predittivo erano: dosaggio del lisozima sierico e del complemento emolitico, elettroforesi delle siero-proteine, conta e formula leucocitaria.

VITELLI A CARNE BIANCA

Nell'ambito di questa categoria zootecnica, abbiamo cercato di definire innanzitutto alcuni parametri di benessere animale derivanti dalla applicazione della moderna tecnologia dei box di gruppo rispetto alle gabbiette singole tradizionali (7). Dal paragone da queste due tecnologie è emerso che:

- Gli incrementi ponderali medi giornalieri e la mortalità sono stati pressoché identici.
- Il costo medio di alimentazione e la spesa per farmaci sono stati inferiori con la nuova tecnologia; quest'ultimo aspetto è indice di migliore situazione sanitaria globale.
- Nei box di gruppo si sono riscontrati valori significativamente più elevati di globuli rossi, emoglobina, ematocrito e ferro.
- Nei vitelli in gabbiette singole si sono osservati valori significativamente più elevati di glucosio ed urea, nonché una persistente leucocitosi caratterizzata da incremento dei polimorfonucleati: tali rilievi suggeriscono fortemente l'esistenza di una prolungata risposta surrenalica, indice di difficoltoso adattamento ambientale.
- La condizione di maggiore sforzo adattativo ambientale (coping) nei vitelli in gabbietta è stata confermata dal più basso rapporto Albumine/Globuline (indice di flogosi endogena) e dal più alto numero di soggetti con risposta di fase acuta del fegato (livelli di aptoglobina).
- La più elevata competenza immunitaria dei vitelli in box è stata confermata dai più elevati indici di blastizzazione linfocitaria da mitogeni.

Dai risultati sopra riportati si evince che la nuova tecnologia dei box di gruppo è sicuramente più rispettosa del benessere animale. Oltre a garantire evidenti bisogni comportamentali del vitello (alzarsi, giacere, accudire a se stessi agevolmente, contatti olfattivi, visivi ed uditivi con gli altri soggetti), tale tecnologia comporta un minore sforzo di adattamento ambientale del vitello, che si riflette in una dinamica più favorevole nel tempo di fondamentali parametri immunologici, ematologici e chimico-clinici.

Tale risultato favorevole è accompagnato da una uguale efficienza produttiva e da costi di produzione addirittura inferiori. Le "performances" favorevoli in box possono essere ragionevolmente ricondotte al fatto che uno stress fisico e psicologico prolungato da isolamento in gabbia può comportare un peggioramento dell'efficienza di utilizzazione della dieta.

In uno studio successivo, è stato analizzato l'influsso del periodo passato in gabbietta singola prima dell'accesso dei vitelli ai box di gruppo. Tale aspetto di organizzazione zootecnica è di fondamentale importanza per le aziende del settore. Si tratta di stabilire se è più conveniente una formazione precoce o tardiva dei gruppi dopo il ristallo degli animali; oltre ad un'ovvia preoccupazione sull'impatto dello stress di formazione dei gruppi, sussistono considerazioni di natura sanitaria (soggetti con patologie in incubazione all'arrivo) e zoo-

tecnica (individuazione degli “scartini” e pareggiamento dei gruppi nei box).

Pur non escludendo l’influsso di componenti ambientali accessorie, diversi tempi di sgabbiamento e di formazione dei gruppi potevano comportare:

- Livelli di glucosio ed urea più elevati, in probabile relazione ad una più elevata e persistente risposta surrenalica.
- Elevata e persistente cupremia.
- Riduzione nel tempo della concentrazione di gamma-globuline plasmatiche e alterazione del rapporto albumine/globuline.
- Un maggior numero di soggetti con risposta di fase acuta del fegato (aptoglobina), da associare ad una maggiore attività ALT di origine epatica.

Ci siamo poi occupati del problema emergente dell’introduzione di diete a base di siero di latte anziché di latte magro per i vitelli a carne bianca; in effetti, l’introduzione massiva di tali nuove diete ha comportato una alterazione del rapporto di correlazione tra % emoglobina e colore delle carni e, soprattutto, ha comportato problemi sanitari non indifferenti in molte aziende. Al di là degli aspetti zootecnici e zoo-economici, è importante sottolineare che tale modifica del regime alimentare per i vitelli a carne bianca ha comportato spesso seri problemi di benessere, evidenziati anche dall’insorgenza di gravi sindromi cliniche anche mortali. Il riscontro pressoché costante in tali affezioni è una normale concentrazione di emoglobina con tenore in ferro plasmatico normale o elevato, non accompagnato da una corrispondente colorazione delle carni.

In un esperimento preliminare su soggetti di 150 giorni di vita circa, alimentati in condizioni omogenee con le due differenti diete, abbiamo potuto effettivamente confermare che nei gruppi alimentati con siero l’emoglobina non si è rivelava un parametro predittivo del colore delle carni e che in taluni vitelli con sintomatologia clinica di gruppo (diarrea e depressione del sensorio) si registravano valori di sideremia abnormemente elevati. In una sperimentazione di campo controllata, abbiamo pertanto monitorato:

1. Vitelli alimentati sempre con mangime a base di siero di latte (box 1).
2. Vitelli alimentati con mangime a base di siero di latte sino al 100° giorno e poi con mangime a base di latte magro sino alla macellazione (box 2).
3. Vitelli alimentati sempre con mangime a base di latte magro (box 3).

A tutti i vitelli è stata somministrata l’integrazione di alimento fibroso (silomais) ai sensi delle disposizioni vigenti. Sulla base dei cartellini disponibili, l’apporto calorico e di ferro delle tre diete in esame era da considerarsi uguale.

Le risultanze principali del nostro studio possono essere riassunte come segue:

- I vitelli del gruppo 3 (solo latte) hanno avuto minori problemi clinici e, di conseguenza, un minore fabbisogno di farmaci a parità di interventi vaccinali ricevuti.
- Il terzo gruppo alimentato con solo latte magro ha dimostrato un “trend” temporale significativamente diverso per quanto concerne il ferro plasmatico totale.
- Tale gruppo ha dimostrato differenze significative per quanto concerne i parametri UIBC (transferrina libera plasmatica), creatinina, IRF (residuo cromatinico nei reticolociti), emoglobina, linfociti totali, NEFA.
- In accordo con sperimentazioni precedenti, la maggiore incidenza di patologie condizionate nei gruppi 1 e 2 era correlata ad un numero significativamente superiore di soggetti con risposta di fase acuta del fegato (aptoglobina).

Pertanto, la maggiore concentrazione plasmatica e, quindi, la maggiore saturazione della transferrina (parametro UIBC) indicano un migliore assorbimento del ferro e una migliore tesaurizzazione tissutale nei vitelli del 3° gruppo alimentati con latte. Al di là di tale aspetto, si può tranquillamente affermare che l’efficienza di trasporto plasmatico del ferro risulterebbe in parte compromessa nei vitelli alimentati con siero di latte; da tale assunto deriverebbe logi-

camente la ridotta correlazione tra concentrazione di emoglobina e colore delle carni.

In una successiva sperimentazione abbiamo paragonato le conseguenze di un prolungato stress da trasporto dalla Polonia con uno stress derivante da un trasporto molto ravvicinato. Nove dei 15 vitelli trasportati dalla Polonia dimostravano uno stato più o meno grave di depressione del sensorio al momento dello scarico dal camion; nessuno invece presentava segni evidenti di disidratazione. Lo stato del sensorio era invece normale per quelli trasportati localmente. Pur con un necessario "caveat" concernente l'esiguità del campione e possibili turbative legate alle condizioni climatiche del trasporto, sono risultate statisticamente significative ($P < 0,05$) le differenze quantitative tra i due gruppi relative ai seguenti parametri: emoglobina, ematocrito, RDW%, proteine totali plasmatiche, albumina plasmatica, glucosio plasmatico, colesterolo plasmatico, bilirubina diretta, urea, fosforo e ferro plasmatici. Nei soggetti trasportati dalla Polonia, i valori medi del fosforo e del glucosio plasmatici sono risultati nettamente diversi da quelli fisiologici dei vitelli nel primo mese di vita. Bisogna inoltre sottolineare che sei vitelli su 15 trasportati dalla Polonia presentavano segni evidenti di risposta di fase acuta del fegato (aptoglobina) a differenza di quelli trasportati localmente. Inoltre, un vitello trasportato dalla Polonia presentava una forte depressione della attività battericida del siero e sei di questi animali avevano presenza di interferan di tipo I (acido stabile) nel siero; un ulteriore animale aveva livelli al limite della significatività

BOVINE DA LATTE

Nell'ambito dell'allevamento delle bovine da latte, gli ultimi decenni sono stati caratterizzati da notevoli cambiamenti che hanno portato ad un considerevole miglioramento qualitativo della produzione di latte, rendendo però il rapporto management-produzione-sanità animale estremamente delicato. In particolare, le bovine da latte ad alta produzione vanno incontro a diversi problemi sanitari derivanti dal bilancio energetico negativo delle prime settimane di lattazione, notevolmente esacerbati nella stagione calda finanche al decesso di alcuni soggetti. Patologie variegata quali dislocazioni abomasali, ritenzioni placentari, aumento del periodo interparto, paresi e para-paresi puerperale sono la punta dell'iceberg di una situazione generalizzata di malessere. Ci siamo proposti pertanto di esaminare alcuni parametri immunologici ed ematologici di bovine da latte ad alta produzione e clinicamente sane, con indice BCS (Body Condition Score) normale nel periodo peripartale; abbiamo volutamente selezionato soggetti in buone condizioni cliniche, con buon grado di adattamento ambientale, per evidenziare l'entità dello sforzo adattativo sotteso a tale condizione. I test utilizzati analizzavano fattori ematologici ed immunologici, relativi alla capacità di risposta innata ed adattativa, fornendo in questo modo preziose indicazioni sullo stato di benessere degli animali, soprattutto riguardo alla possibile insorgenza di sindromi condizionate. In questo senso, abbiamo osservato innanzitutto una elevata e persistente α -globulinemia, da considerarsi fenomeno para-fisiologico. Le α_1 e α_2 globuline comprendono infatti una vasta gamma di proteine che vanno incontro ad incremento in seguito a diverse condizioni patologiche, come ad esempio infiammazioni acute, sindromi nefrosiche o affezioni epatiche. E' presumibile che l'elevato sforzo produttivo cui le bovine sono sottoposte si ripercuota a livello epatico, causando l'attivazione di circuiti di regolazione di fenomeni flogistici endogeni e determinando in particolare un aumento della sintesi delle α -globuline e una diminuzione delle albumine. A questa ragione probabilmente si può ricondurre il consumo di complemento evidenziato nella nostra sperimentazione sempre intorno al parto. Abbiamo inoltre osservato valori elevati di aptoglobina (risposta di fase acuta) appena dopo il parto, correlabili all'incremento dei glucocorticoidi. La debole capacità di risposta blastica dei linfociti nel periodo peripartale, da noi rilevata, può essere correlata alle modificazioni dei livelli ormonali propri

di questa fase o del bilancio energetico dell'animale.

L'esperienza accumulata su diversi campioni provenienti dal campo da aziende "problema" ci consente inoltre di sottolineare l'importanza dei seguenti parametri:

- Aptoglobina, correlabile ad una risposta di fase acuta del fegato, indice prognostico negativo.
- Bilirubina totale, correlabile alla insorgenza delle patologie sopra descritte.
- Gamma-globuline, aumentate per effetto della pressione infettante dell'ambiente.
- Conta dei neutrofili e/o dei monociti circolanti, correlabile alla risposta omeostatica verso le flogosi endogene.
- Corpi chetonici e acidi grassi non esterificati.
- Enzimi epatici e muscolari
- Elettroliti.

CONCLUSIONI

I parametri interpretativi sopra delineati non possono comprendere tutta la varietà e le possibili articolazioni delle condizioni di benessere della specie bovina. Vogliono soprattutto essere una indicazione di metodo, aperta ai contributi esterni dei ricercatori e dei colleghi veterinari che operano nel campo. Siamo altresì coscienti che la complessità analitica e concettuale della problematica del benessere animale può essere adeguatamente affrontata solo con un approccio combinato, multidisciplinare, di cui i saggi di laboratorio sopra ricordati costituiscono una componente importante, ma non esaustiva.

BIBLIOGRAFIA

- 1) AMADORI M. ET AL.(1997), *J. Vet. Med. B* 44, 321 – 327
- 2) BAKER D.H. ET AL (1999), *Pig News and Information* 20,(4), 123 -.124
- 3) BROOM D.M. AND JOHNSON K.G. (1993), *Stress and Animal Welfare*, 1st Edition, Chapman & Hall, London.
- 4) CAMPBELL T. ET AL. (2001), *Brain Behav. Immun.*, 15, 235 – 254
- 5) CHETVERIKOVA L.K. ET AL. (1987), *Acta Virol.* 31, 424-433
- 6) DOBBS C.M. ET AL. (1993), *J. Neuroimmunol.*, 48, 151 – 160.
- 7) FAZIA M. ET AL. (2000), *La Selezione Veterinaria* (10), 867-878
- 8) JANEWAY C.A. (1989), *Nature*, 341, 108.
- 9) JOHNSON R.W. (2001), *Proceedings 6th International Veterinary Immunology Symposium*, Uppsala, Sweden, July 15-20, pp 68.
- 10) KANDA T. ET AL. (1999), *Life Sci.* 64, 93 – 101.
- 11) MOBERG G.P. (1985), BIOLOGICAL RESPONSE TO STRESS: KEY TO ASSESSMENT OF ANIMAL WELL-BEING? IN ANIMAL STRESS (ed. G.P. Moberg), American Physiological Society, Bethesda, Maryland, pp 27-49.

VERGA M., NORMANDO S.*, CONSONNI S., CANALI E.

Istituto di Zootecnica - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Milano
* Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie, Università di Padova

INDICATORI INTEGRATI DI BENESSERE NEL VITELLO A CARNE BIANCA

Parole chiave: benessere, vitelli a carne bianca, formazione dei gruppi, età.

SOMMARIO

La normativa comunitaria in materia di benessere nell'allevamento del vitello impone il divieto di allevare singolarmente i soggetti oltre le otto settimane di età. È quindi sembrato necessario stabilire se esistesse un'età ottimale per la formazione dei gruppi di allevamento. Con questo studio ci si è, quindi, proposti di contribuire a determinare se esistessero differenze significative a livello di indicatori integrati di benessere tra vitelli a carne bianca raggruppati a 20 o 30 giorni dall'entrata in allevamento. A tal fine 40 vitelli maschi frisoni provenienti da ristallo nazionale, sono stati divisi in due gruppi di uguale numerosità, di cui uno in cui i vitelli sarebbero stati raggruppati, in box da cinque animali ciascuno, a 20 giorni dall'entrata in allevamento, il secondo a 30 giorni. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad osservazione tramite *istantaneous scan sampling* ogni 2', per sei ore, a quattro giorni dalla rimozione dei separatori, e a 116 e a 151 giorni dall'entrata in allevamento. Inoltre sono stati eseguiti test comportamentali di reattività a 35, 118, 153 giorni e prelievi ematici a 18, 38 e 130 giorni. Sono inoltre state rilevate, alla macellazione, la presenza e le dimensioni dei pilobezoari. I vitelli raggruppati a 20 giorni presentano, a quattro giorni dalla rimozione dei separatori, una maggior percentuale di tempo trascorso in stazione rispetto a quelli raggruppati a 30 giorni. Una maggior inattività in stazione e presenza di stereotipie nei vitelli raggruppati più precocemente si nota anche sul totale delle tre osservazioni. I livelli di emoglobina non risultano significativamente diversi tra i due gruppi, e comunque sono maggiori di quelli prescritti dalla Direttiva comunitaria. La presenza di pilobezoari è piuttosto esigua e non differisce tra i due gruppi.

INTRODUZIONE

Il benessere degli animali nell'allevamento intensivo è stato oggetto di una notevole attività legislativa a livello comunitario e nazionale. Tale attività ha interessato anche l'allevamento del vitello a carne bianca (D.L. n. 533 del 30/12/1992 e D.L. n. 331 del 1/9/1998), introducendo radicali cambiamenti in questo settore produttivo, spesso recepito dall'opinione pubblica come non adeguato a soddisfare le esigenze degli animali in termini di benessere. Si ricorda che, con tale termine, si può intendere uno "stato di salute completa, sia fisica sia mentale, in cui l'animale è in armonia con il suo ambiente" (Hughes , 1976), come pure l'insieme delle "risposte che l'animale mette in atto per adattarsi all'ambiente in cui si trova" (Broom, 1986).

Uno degli aspetti più interessanti della nuova normativa sul benessere dei vitelli in allevamento è quello che prevede il divieto di allevare i vitelli singolarmente oltre le otto settimane d'età. Ciò, se da una parte tende ad una maggior soddisfazione delle esigenze comporta-

mentali della specie, cercando di avvicinare le condizioni di allevamento ad una ipotetica situazione naturale, dall'altra pone ingenti problemi pratici ed economici per gli allevatori che si trovano spesso a dover intraprendere una completa ristrutturazione degli impianti esistenti. Inoltre, un così drastico cambiamento impone nuove scelte e nuove strategie le quali, a loro volta, potrebbero avere delle ricadute sul benessere dei soggetti. Non è, altresì, da dimenticare che la medesima scelta di management può avere ripercussioni di segno opposto sul benessere dei soggetti, a seconda dell'aspetto preso in considerazione. Per esempio, la stabulazione di gruppo, se ha il vantaggio di dare una maggior possibilità per l'estrinsecarsi di comportamenti sociali, potrebbe permettere altresì una maggior diffusione di parassitosi e malattie infettive rispetto ad un management che preveda che l'animale sia allevato in isolamento. Uno degli interrogativi sollevati dalla nuova normativa riguarda l'età per la formazione dei gruppi di allevamento, dato che il dettame legislativo non indica un'età al di sotto della quale possa essere sconsigliato stabulare i soggetti in box collettivi. E' tuttavia noto che il bovino è una specie "hider", cioè una specie in cui i neonati rimangono per la maggior parte del tempo isolati in un luogo riparato, cui la madre fa ritorno di tanto in tanto per allattare (Albright e Arave, 1997). L'integrazione del vitello in un gruppo di pari, in condizioni naturali, è, quindi, tardiva e la maggior parte delle interazioni sociali del giovane soggetto sono rivolte verso la madre per tutto il primo mese di vita (Le Neindre, 1991). Peraltro è stato constatato che vitelli separati dalla madre tendono immediatamente a formare gruppo tra loro (EU Scientific Veterinary Committee, 1995). Nel moderno allevamento, invece, i soggetti vengono, per una esigenza dell'allevatore delle vacche da latte, allontanati dalla madre molto precocemente e giungono alla stalla di ingrasso entro le tre settimane di età. L'eventuale età di formazione dei gruppi è, poi, variabile, in quanto il raggruppamento precoce degli animali, se da un lato permette un risparmio di manodopera, dall'altro impedisce un controllo dei consumi del singolo e quindi un più preciso pareggiamento. D'altra parte è stato rilevato che, dal punto di vista produttivo, i vitelli allevati in gruppo ottengono livelli di accrescimento migliori rispetto a quelli allevati in box individuale (Verga *et al.*, 2000). E', quindi, estremamente importante cercare di identificare l'eventuale momento ottimale per la formazione dei gruppi di allevamento, sia per garantire il benessere dei soggetti allevati, sia per poter fornire agli allevatori delle indicazioni utili per la razionalizzazione di questo aspetto del management aziendale. In tale ricerca, come per la maggior parte delle istanze che riguardano il benessere animale, di grande aiuto si rivelano i parametri comportamentali, che rappresentano spesso la prima spia di malessere di soggetti mantenuti in situazione non idonea (Broom e Johnson, 1993). A tale fine va considerato l'"etogramma" di un animale, cioè il suo repertorio comportamentale: le reazioni comportamentali ci indicano appunto il grado d'adattamento e ci segnalano eventuali stati di disagio (Canali *et al.*, 1998). All'interno dell'etogramma, anche posture diverse, correlate al diverso tipo di sonno ed alla quantità di spazio disponibile, mettono in evidenza la possibilità o meno che i vitelli hanno di assumere posizioni che consentono loro un adeguato rilassamento muscolare (Friend & Dellmeier, 1988). Il sonno, in particolare quello profondo, è indispensabile per la salute ed il benessere dei vitelli e l'individuazione di alcune posture piuttosto che altre ci permette di capire se l'animale ha la possibilità o meno di riposare.

Un altro aspetto dell'etogramma particolarmente interessante è la comparsa di 'stereotipie comportamentali'. Anche se non possono essere considerate una categoria omogenea (Mason, 1991), le stereotipie sono comportamenti anormali, ripetitivi, invariabili e senza fine o funzione ovvia (Odberg, 1978; Mason, 1991; Lawrence & Rushen, 1993). Kiley-Worthington (1977) le definisce come forme "esagerate" di comportamenti normali: questi, infatti, vengono manifestati in modo prolungato ed estremamente ripetitivo. Sembra però che eseguire stereotipie possa costituire un rinforzo positivo per l'animale e che questa esecuzione non sia una risposta immediata ad una determinata situazione, ma si sviluppi in un certo

periodo di tempo (Blackshaw & McVeight 1984; Cronin *et al.*, 1986). Anche se tra gli Autori non c'è accordo sul loro significato (Mason, 1991), tali comportamenti sembrano svilupparsi quando l'animale è frustrato in modo ripetuto o cronico (Broom, 1983; Wiepkema, 1987; Salzen, 1990).

Le stereotipie orali rappresentano i comportamenti anomali più comuni. Esse comprendono il *tongue-playing* ed il *tongue-rolling*. Sono entrambi giochi effettuati con la lingua: nel *tongue-playing* il vitello estende e piega la lingua lateralmente, facendola girare all'esterno della bocca, arrotolandola e srotolandola. Nel *tongue-rolling*, invece, la lingua viene arrotolata e srotolata ripetutamente all'interno della bocca, la quale può essere aperta o socchiusa. Generalmente la testa viene tenuta verso l'alto e gli occhi possono roteare. Il *tongue-rolling*, in particolare, sembra svilupparsi per effetto di contatti sociali assenti e di scarsa attività a scopo nutritivo: esso, infatti, compare soprattutto in vitelli stabulati in box singoli ed alimentati solo con latte (Vessier *et al.*, 1998). Il *tongue-playing*, invece, sembra derivare dalla mancanza di attività orali estremamente importanti per il vitello, come l'allattamento, il pascolare e la masticazione (Fraser e Broom, 1990). E' possibile che l'eliminazione della fase di allattamento dia problemi conflittuali al vitello, essendo molto motivato a tenere questo tipo di comportamento. E' stato osservato, nei numerosi studi effettuati su queste stereotipie, che il *tongue-playing*, in particolare, viene manifestato soprattutto dopo i pasti. Broom (1983) afferma che le condizioni di benessere del vitello sono da reputarsi "non buone", se il tempo occupato da comportamenti stereotipati è uguale o maggiore del 10% della vita (da sveglia) di un animale. Sia Albright *et al.* (1991), sia de Wilt (1985), osservando vitelli Holstein di 5-17 settimane, hanno notato una % di *tongue-playing*, nelle 24 ore, comprese tra il 2% ed il 5%.

All'osservazione di parametri comportamentali è utile affiancare il contemporaneo rilevamento di parametri di natura fisiologica e immunitaria che possano contribuire ad una lettura più organica del quadro nel suo insieme, come consigliato in letteratura (Broom e Johnson, 1993). Nel vitello a carne bianca, mantenere un livello ottimale è garanzia di un migliore stato sanitario dell'animale, oltre ad essere importante in quanto favorisce una maggiore ingestione di alimento ed un superiore livello di accrescimento corporeo (Reece e Hotchkiss, 1987). Da studi fatti in passato si è notato che i valori di emoglobina in vitelli allevati in gabbie singole erano minori rispetto a quelli allevati in box di gruppo: 7.7 vs. 10.9 g/100ml (Andrighetto *et al.*, 1998).

SCOPI

Con il presente studio si è voluto indagare eventuali effetti, sul benessere in vitelli a carne bianca, del raggruppamento a differenti età, cioè a 20 o a 30 giorni dall'entrata in allevamento, mediante lo studio delle variazioni di alcuni indicatori integrati di benessere. Si è inteso incentrare l'attenzione sulle variabili comportamentali, considerando diversi aspetti del repertorio comportamentale ('etogramma') in relazione al tipo di trattamento, ed in particolare l'insorgenza e le caratteristiche di eventuali 'stereotipie' comportamentali. Sempre in relazione al trattamento, si è inteso valutare le eventuali differenze di reattività degli animali verso la presenza dell'uomo, inteso sia come persona nota che ignota. Agli indicatori comportamentali si sono affiancati alcuni indicatori di tipo più 'funzionale', quali i livelli di emoglobina e la presenza di pilobezoari valutata alla macellazione, in quanto direttamente collegabili alle caratteristiche comportamentali ed allo stato di 'benessere' dei vitelli oggetto di indagine.

MATERIALI E METODI

Animali e management

Per la ricerca sono stati impiegati 40 vitelli maschi di razza frisona derivanti da ristallo nazionale. Al momento della sperimentazione, tali vitelli erano stabulati in box con pavimento fessurato in legno di 9 m² di area, in numero di 5 per box. Precedentemente i soggetti erano stati stabulati ed alimentati singolarmente all'interno del medesimo box mediante l'uso di tramezzi. I soggetti sono stati divisi in 2 gruppi di 20 elementi ciascuno (4 box per trattamento, 5 soggetti per box). Per il primo gruppo si sono eliminati i separatori al ventesimo giorno di stabulazione, per il secondo gruppo al trentesimo.

I vitelli ricevevano 2 pasti a base di latte ricostituito non acidificato a 42°C, formulato in accordo alla fase di accrescimento degli animali. Oltre al latte, agli animali veniva somministrato silomais, da 50 gr. alla terza settimana di vita fino a 700 gr alla fine del periodo di ingrasso. Il fronte mangiatoia era di 57 cm per capo.

Rilievi comportamentali

Per le prove comportamentali, i vitelli sono stati osservati mediante *instantaneous scan sampling* (Martin & Bateson, 1986) ogni 2 minuti per un totale di sei ore per osservazione. Le osservazioni sono state effettuate in 3 momenti: prima e dopo i due pasti a base di latte (4.30-6.30 e 14.30-16.30) e lontano dai pasti (9.00-11.00). Tali osservazioni sono state compiute il 4° e 5° giorno dalla riunione in gruppo, e, quindi, al 24°-25° giorno dall'arrivo per il primo gruppo, e al 34°-35° per il secondo con ripetizione al 116°-118° e al 151°-153° giorno per ambedue i gruppi. L'etogramma parziale usato per le osservazioni comportamentali è riportato in tabella 1. Dall'analisi dei risultati ottenuti durante la prima osservazione si sono, in seguito, scelti i comportamenti più frequenti da sottoporre a successive analisi sul totale delle tre osservazioni (tab. 2). Si è posta particolare attenzione al rilevamento delle 'stereotipie comportamentali', quali *tongue playing* e *tongue rolling*.

Nel periodo tra la prima e la seconda osservazione, tre vitelli appartenenti al primo gruppo hanno presentato problemi di accrescimento e sono quindi stati spostati in altro box. Essi sono stati, conseguentemente, eliminati dalla successiva sperimentazione.

Al 35°, al 118°, e al 153° giorno sono stati eseguiti, su tutti i vitelli, test comportamentali di reattività, in particolare i test di avvicinamento ad una persona nota e ad una persona ignota, misurando quanti e quali vitelli si avvicinassero all'operatore e i relativi tempi di latenza.

Prove funzionali

Tutti i soggetti sono stati sottoposti a prelievo ematico al 18°, al 38° e al 130° giorno per la valutazione di diversi parametri funzionali. I parametri ematici sono stati analizzati da parte dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia (sede di Brescia) secondo le metodiche riportate in letteratura (Amadori *et al.*, 1997). Nel presente lavoro vengono presi in considerazione solo i livelli di emoglobina, in quanto rilevanti al fine della discussione dei risultati sui livelli di benessere dei vitelli analizzati.

Alla macellazione, infine, si sono rilevate la presenza e la dimensione di pilobezoari.

Analisi statistiche

Sulle variabili comportamentali sono state calcolate medie e frequenze ed è stata eseguita una analisi della varianza non parametrica (Kruskal-Wallis) (SAS, 1989). Sui parametri ematici sono

state calcolate le medie e si è effettuata una analisi della varianza secondo il modello GLM. Sui dati di reattività comportamentale è stato effettuato il test esatto di Fisher (SAS, 1989).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Repertorio comportamentale

In totale i vitelli del 1° gruppo trascorrevano significativamente meno tempo in decubito ($P=0.0008$) dei soggetti del gruppo 2 (Fig. 1). L'andamento crescente del decubito, dalla prima alle altre osservazioni, sembrerebbe contrastare con l'andamento normale che il fenomeno presenta in funzione dell'età. Il contrasto però risulta legato ai risultati della prima osservazione, in quanto le percentuali di decubito nelle altre sono comparabili a quelle riportate in letteratura. Ciò che si differenzia quindi sono i ridotti tempi di decubito alla Ia osservazione, quindi poco dopo il raggruppamento degli animali. E', infatti, noto che il tempo trascorso in decubito passa da circa il 90% a 1-5 settimane, a circa il 75% a 21-25 settimane e 69% a 5 mesi (Albright e Arave, 1997). In uno studio su vitelli a carne bianca stabulati con tre sistemi differenti, Bokkers e Koene (2001) riscontrarono una maggior percentuale di tempo trascorso in stazione nel sistema identificato come peggiore dal punto di vista del benessere dagli altri parametri usati. Tale dato suggerirebbe che la differenza evidenziata nell'attuale studio possa essere ascrivibile ad un maggiore stato di disagio dei vitelli raggruppati a 20 giorni dall'entrata in allevamento rispetto a quelli riuniti più tardivamente. Il decubito di tipo A (sternale, con arti raccolti), in cui il vitello riposa ma è sveglio ed attento all'ambiente circostante (de Wilt, 1985), è risultato significativamente differente nei due trattamenti ($P = 0.0037$, Fig.2), a differenza, invece, del decubito di tipo F (sternale con tutti gli arti raccolti e testa girata indietro sopra il corpo del vitello), associato al sonno R.E.M., le cui analisi statistiche non hanno rivelato differenze significative tra i due trattamenti. Prendendo in considerazione i due tipi di decubito maggiormente osservati, si è verificato che il decubito di tipo A è significativamente differente nelle tre osservazioni solo per il primo trattamento, a differenza del decubito di tipo F il quale va diminuendo nelle tre osservazioni ma non ci sono differenze significative.

Differenze tra i due gruppi si rilevano anche relativamente all'inattività in stazione ($P=0,0055$) (fig. 3), che risulta più elevata nei soggetti del gruppo 1.

Inoltre, per quanto riguarda le osservazioni comportamentali a 5 giorni dalla rimozione dei separatori, i vitelli raggruppati a 20 giorni dall'entrata in allevamento presentavano un'attività orale più intensa. Essi, infatti, leccavano con maggior frequenza sia le strutture che gli altri vitelli ($P=0.0005$ e $P=0.0034$, rispettivamente), bevevano urina ($P=0.0237$) e masticavano a vuoto in stazione ($P=0.0224$) di più dei vitelli cui i separatori erano stati tolti a 30 giorni dall'entrata in allevamento. I vitelli del secondo gruppo, invece, annusavano più di frequente le strutture ($P=0.0008$), dedicavano maggior tempo ad alcuni comportamenti collegati alla cura del corpo, come il pulirsi in decubito ($P=0.0052$) e il grattarsi la testa ($P=0.0464$), e giocavano di più con gli altri vitelli ($P=0.0034$).

Il secondo gruppo di trattamento mostra anche una tendenza ad aumentare nel tempo le attività rivolte verso le strutture ($P = 0.0001$), in accordo con studi precedenti (Tosi 1998), in cui la percentuale di tempo dedicata a questa attività è risultata praticamente analoga (circa il 6%). Fraser (1985) afferma che tutti gli animali mostrano una forte motivazione ad esplorare ed investigare l'ambiente circostante ma nota, altresì, che questo comportamento tende a diminuire una volta che questo ambiente sia divenuto usuale, a meno che non venga introdotto un elemento di novità. Questo è stato riscontrato nella presente sperimentazione solo per quanto riguarda le attività verso la mangiatoia.

Alcune delle differenze statisticamente riscontrate nella prima osservazione potrebbero essere dovute anche alla diversa età dei soggetti in questo momento; tale variabile non è

però eliminabile qualora si voglia mantenere costante il tempo trascorso dall'eliminazione dei separatori. E' noto, per esempio, come il gioco sociale aumenti con l'età (Haupt, 1998).

Tuttavia si rileva anche una maggiore presenza di stereotipie ($P=0.0045$) a carico dei soggetti del gruppo 1 (fig. 4). Tale differenza, non significativa nella prima osservazione, risulta invece statisticamente significativa nella seconda ($P= 0.0189$) e tendenzialmente nella terza osservazione ($P= 0.0625$) escludendo, quindi, la possibilità che fosse ascrivibile alla differente età dei soggetti all'epoca della prima osservazione.

Per quanto riguarda le differenze dovute all'orario e alla vicinanza con i pasti, i dati confermano che il comportamento di suzione reciproca avviene soprattutto in vicinanza dei pasti (de Passillé et al., 1992; Lidfors, 1993; Sato et al., 1994; Rushen e de Passillé, 1995; de Passillé e Rushen, 1997) (fig. 5, fig. 6). Interessanti sotto questo punto di vista anche altri comportamenti orali quali il leccare altri vitelli (fig. 7) e il self-grooming (toeletta)(fig. 8), come pure le stereotipie orali (fig. 9, fig. 10). Queste ultime si presentano soprattutto prima dei pasti, lasciando ipotizzare una situazione di anticipazione legata presumibilmente all'attesa del pasto ed agli stimoli condizionali che precedono la somministrazione dell'alimento. Tale anticipazione è più presente nei vitelli del Gruppo 1.

La suzione incrociata (cross-sucking) si manifesta con frequenze piuttosto basse (Fig. 6), e soprattutto dopo i pasti. Questo concorda con quanto affermano de Passillé et al. (1992), ovvero che l'assunzione del latte stimola il riflesso di suzione che si riflette nel cross-sucking, di conseguenza ha una maggior frequenza di manifestazione dopo i pasti. In altri studi (Tosi, 1998, Fumagalli, 1999) è stata rilevata una tendenza, nei vitelli allevati in box, a leccare i loro compagni; questo comportamento, in tutti i mammiferi, ha il significato di inserimento nel gruppo (de Wilt, 1985). Per quanto riguarda l'andamento di questo comportamento nelle tre osservazioni, si nota nel secondo trattamento una tendenza a diminuire con l'aumentare dell'età, mentre nel primo gruppo di vitelli si è osservato un aumento nel secondo periodo di osservazione ed un ritorno a livelli più bassi nell'ultima.

Il comportamento definito "self-grooming" non rileva differenze statisticamente significative tra i due gruppi di trattamento. Si nota, comunque, che nel primo periodo i vitelli del trattamento 2 dedicavano una quantità di tempo maggiore, rispetto ai vitelli del trattamento 1, alla pulizia del proprio corpo, mentre nelle osservazioni successive si è verificato il fenomeno opposto (Fig.8). La spiegazione sta, probabilmente, nel fatto che i vitelli del primo trattamento esibivano con maggior frequenza altri comportamenti quali stereotipie e leccare un altro vitello in stazione, in modo particolare nella prima osservazione. In generale Albright ed Arave (1997) avevano osservato che i vitelli allevati in gabbiette fino a 30 giorni di età dedicavano al "self-grooming" un tempo maggiore rispetto ad animali rimasti in condizioni naturali.

Test comportamentali di reattività

Le analisi effettuate sui test di reattività eseguiti a 35 giorni dall'entrata in allevamento non hanno evidenziato differenze significative nella latenza all'avvicinamento tra prova con persona nota e prova con persona ignota né per il trattamento 1, né per il trattamento 2 ($P=0.7572$ e $P=0.4075$, rispettivamente). Tale dato conferma quanto riportato in letteratura (de Passillé et al., 1996), cioè il fatto che i vitelli tendono ad esplorare analogamente persone note ed ignote, sempre che non ricevano trattamenti avversativi. Tuttavia un maggior numero di animali si avvicinava alla persona nota nella prova eseguita a 35 giorni, e alla persona ignota nelle due prove eseguite più tardi, il che potrebbe indicare l'aumento di un'attività esplorativa. Ugualmente non si sono riscontrate differenze statisticamente significative tra i due trattamenti né per la prova con persona nota, né per quella con persona ignota ($P=0.5006$ e $P=0.0735$, rispettivamente). Ugual risultato hanno dato le prove eseguite al 118° ($P=0.525$; $P=0.538$; $P=0.160$; $P=0.180$ rispettivamente) e al 153° giorno ($P=0.361$; $P=0.244$; $P=0.534$; $P=0.354$ rispettivamente). I dati relativi alle prove di reattività sono riassunti in tabella 3.

Altre variabili

I livelli di emoglobina non sono risultati differenti tra i due trattamenti, ma meritano comunque di essere presentati per le note implicazioni legislative e per il significato sul benessere dei vitelli a carne bianca. La percentuale di emoglobina (g/dl) nei tre prelievi presenta, in entrambi i trattamenti, un aumento nel secondo prelievo: ciò è dovuto al fatto che i vitelli, dal primo giorno di allevamento, assumono latte contenente ferro e, dalla terza settimana, anche una parte di insilato. Nel terzo prelievo la quantità di emoglobina riscontrata nelle analisi diminuisce in entrambi i trattamenti: i vitelli, infatti, sono alimentati con latte privo di ferro ed assumono questo elemento solo attraverso l'insilato. I valori di emoglobina riscontrati sono comunque superiori ai "minimi" dettati dalla legge (7.25 vs. 9.04/9.39 g/dl) in entrambe i trattamenti (Tabella 4).

Per quanto riguarda i pilobozoi, ne sono stati trovati solo in 3 animali con dimensioni superiori a 5 cm, ed in 6 animali con dimensioni inferiori ai 5 cm, a conferma del fatto che il comportamento di "self-grooming" non è stato effettuato con frequenze elevate.

CONCLUSIONI

Una maggiore permanenza in stazione, ed una maggior presenza di stereotipie non legata al fattore età ed in aumento durante i tre periodi di osservazione effettuati, riscontrate nei vitelli raggruppati più precocemente, suggeriscono che una formazione dei gruppi a 20 giorni dall'entrata in allevamento possa comportare maggiore stress per i soggetti che un raggruppamento a 30 giorni. Ciò si può dedurre anche dalla maggiore tendenza dei soggetti raggruppati a 30 giorni ad un aumento dell'attività esplorativa in relazione all'età. I livelli di emoglobina risultano superiori a quanto disposto dalle norme legislative comunitarie.

Infine la reattività verso l'uomo risulta analoga nei due gruppi, con una tendenza alla riduzione, in relazione all'età, dei comportamenti di evitamento a vantaggio di quelli di avvicinamento, anche verso la persona sconosciuta, il che indica una progressiva abitudine degli animali al contatto con l'uomo e quindi alla riduzione del 'timore' nei suoi confronti.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale per la Lombardia e per l'Emilia, sia per il supporto economico per lo svolgimento della presente indagine che per la realizzazione delle analisi ematiche, per cui si ringraziano in particolare la Dott.ssa Ivonne Archetti e la Dott.ssa Claudia Boldetti. Un sentito ringraziamento inoltre al Dr. Faustini. Infine si ringraziano il Dott. Gian Luca Vercelli, il sig. "Gianni" e tutto lo "staff" dell'allevamento due V. per la gentilezza e disponibilità,

Tab. 1: codifica dei comportamenti.

COMPORAMENTO	SIGLA	OGGETTO	SIGLA OGG.	STAZIONE (S) o DECUBITO (D)	NOTE
Inattività	I	-	-	S/D	Diversi tipi di decubito: a,b,c,d,e,f,g.
Movimento	Mov	-	-	S/D	
Locomozione	W	-	-	S	
Transizione D=>S	D=>S	-	-	-	
Transizione S=>D	S=>D	-	-	-	
Alimentazione	F	-	-	S	
Bere	Dr	-	-	S	
Leccare	L	Mangiatoia	M	S(D)	
		Strutture	S	S/D	
		Vitello (-, or., tar.)	V	S/D	In genere, orecchio, marca.
Mordere (lingua fuori): nibbling	N	Mangiatoia	M	S(D)	
		Strutture	S	S/D	
		Vitello	V	S/D	
Mordere (lingua in bocca): biting	B	Mangiatoia	M	S(D)	
		Strutture	S	S/D	
		Vitello	V	S/D	
Annusare	A	Mangiatoia	M	S(D)	
		Strutture	S	S/D	
		Vitello	V	S/D	
Suzione	S	Mangiatoia	M	S(D)	
		Strutture	S	S/D	
Cross-sucking	CS	-	-	S/D	
Masticare a vuoto	MV	-	-	S/D	
Gioca con la lingua fuori (tongue playing)	TP	-	-	S/D	
Gioca con la lingua in bocca (tongue rolling)	TR	-	-	S/D	
Rotare gli occhi	ER	-	-	S/D	
Beve urina	BU	-	-	S/D	
Urinazione	U	-	-	S	
Defecazione	D	-	-	S	
Pulirsi (leccandosi)	P	-	-	S/D	
Grattarsi	G	-	-	S/D	
Grattarsi la testa	GT	-	-	S/D	
Strofinarsi (rub)	R	Strutture	S	S/D	
		Vitello	V	S/D	
Gioco motorio	GM	-	-	S	
Monta	M	(vitello)	-	S	
Gioco con vitello	GV	-	-	S/D	
Attività gen.	At	Mangiatoia	M	S(D)	
		Strutture	S	S/D	
		Vitello	V	S/D	
Vocalizzazioni	V	-	-	S/D	
Altro (specificare)	S/D	

LVgen, LVor, LVtar e NV sono stati successivamente riuniti in LVtot

Tab. 2: variabili comportamentali sottoposte ad analisi della varianza non parametrica sul totale delle tre osservazioni

<i>Comportamento</i>	
<i>Totale decubito</i>	<i>Attività Mangiatoia</i>
<i>Totale stazione</i>	<i>Attività Strutture</i>
<i>Inattività in stazione</i>	<i>Stereotipie (TP+TR)</i>
<i>Inatt. decubito Tipo A</i>	<i>Self-grooming</i>
<i>Inatt. decubito Tipo F</i>	<i>Cross-sucking</i>

Tab. 3: risultati delle prove di reattività

Prova n. 1

	Tratt. 1				Tratt. 2			
	Persona nota		Persona ignota		Persona nota		Persona ignota	
	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)
<i>Avvicinano in 1/2 min.</i>	1	5	5	25	3	15	1	5
<i>Avvicinano in 1 min.</i>	5	25	1	5	0	0	1	5
<i>Avvicinano in >1 min.</i>	2	10	1	5	2	10	0	0
<i>Avvicinano TOT</i>	8	40	7	35	5	25	2	10

Prova n. 2

	Tratt. 1				Tratt. 2			
	Persona nota		Persona ignota		Persona nota		Persona ignota	
	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)
<i>Avvicinano in 1/2 min.</i>	3	17.7	3	17.64	2	10	2	10
<i>Avvicinano in 1 min.</i>	1	5.86	1	5.88	2	10	1	5
<i>Avvicinano in >1 min.</i>	2	11.74	4	23.54	0	0	2	10
<i>Avvicinano TOT</i>	6	35.3	8	47.06	4	20	5	25

Prova n. 3

	Tratt. 1				Tratt. 2			
	Persona nota		Persona ignota		Persona nota		Persona ignota	
	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)	N°	(%)
<i>Avvicinano in 1/2 min.</i>	4	23.53	7	41.18	3	15	4	20
<i>Avvicinano in 1 min.</i>	1	5.88	2	11.76	1	5	2	10
<i>Avvicinano in >1 min.</i>	1	5.88	2	11.76	2	10	3	15
<i>Avvicinano TOT</i>	6	35.29	11	64.70	6	30	9	45

Tab. 4: concentrazioni di emoglobina

	<i>EMOGLOBINA (g/dl)</i>			
	<i>Trattamento 1</i>		<i>Trattamento 2</i>	
	<i>Media</i>	<i>SD</i>	<i>Media ± SD</i>	
<i>Prelievo n° 1</i>	9,51	0,34	9,72	0,32
<i>Prelievo n° 2</i>	10,38	0,20	11,10	0,19
<i>Prelievo n° 3</i>	9,39	0,24	9,04	0,23

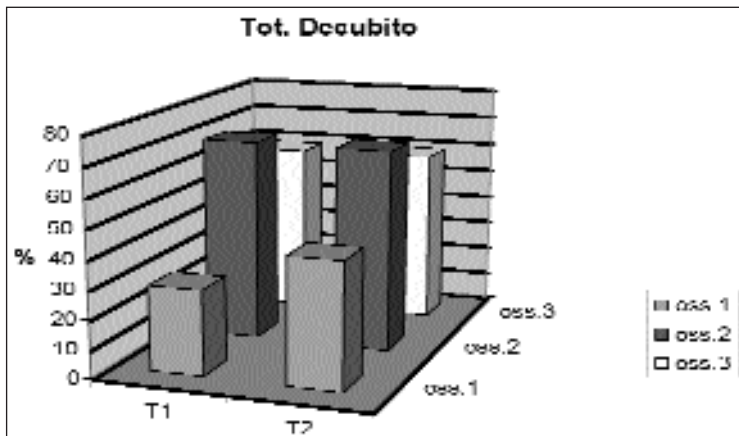


Fig. 1: Periodo di **decubito**, nelle differenti tipologie stabulative, in funzione dell'osservazione.

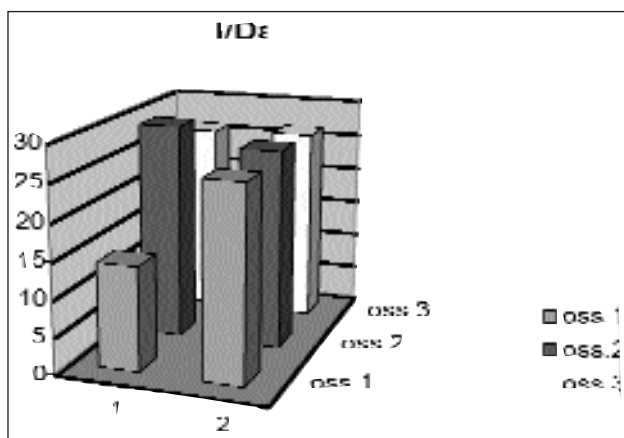


Fig. 2: Frequenze del comportamento **“Inattivo, Decubito tipo A”** nel **Trattamento 1 e 2**, in funzione del periodo di osservazione.

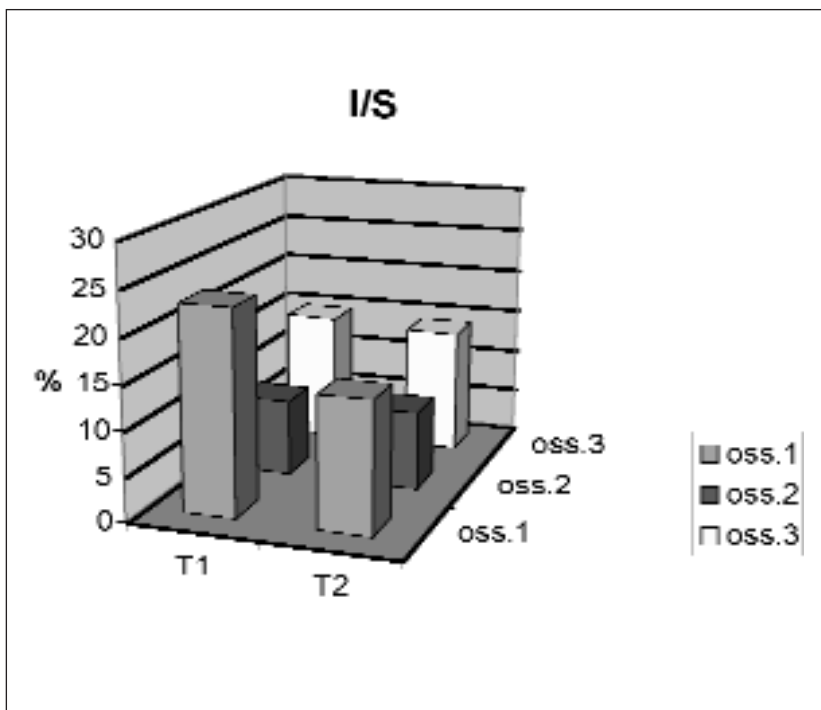


Fig. 3: Frequenze del comportamento “Innativo, Stazione” nel **Trattamento 1 e 2**, in funzione del periodo di osservazione.

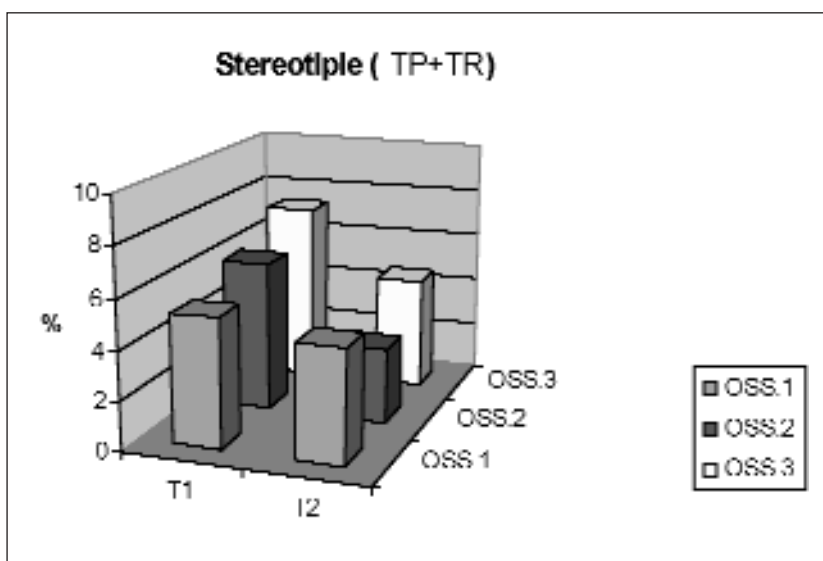


Fig. 4: Frequenze del comportamento “Stereotipe” nel **Trattamento 1 e 2**, in funzione del periodo di osservazione.

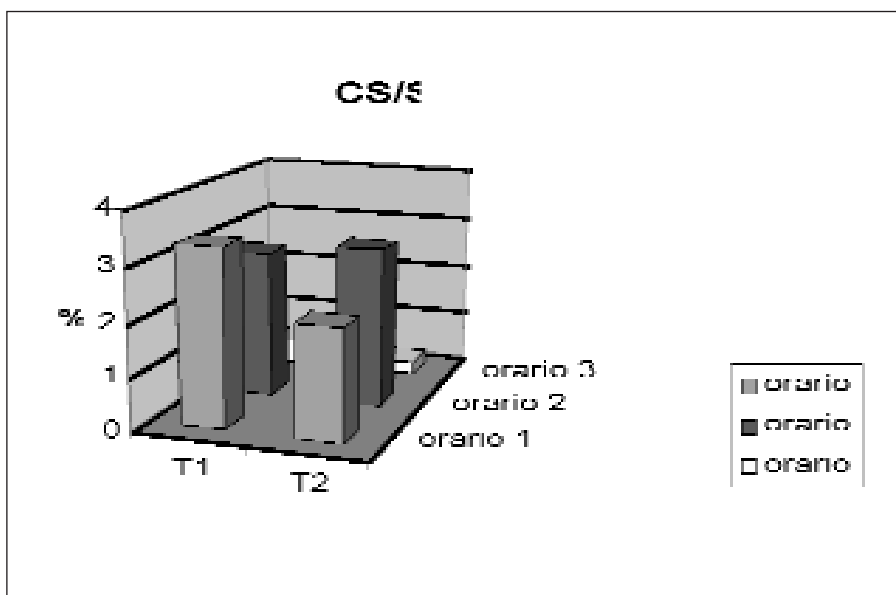


Fig. 5: Frequenze del comportamento “Cross Sucking, in Stazione” nel **Trattamento 1 e 2**, in funzione dell’orario.

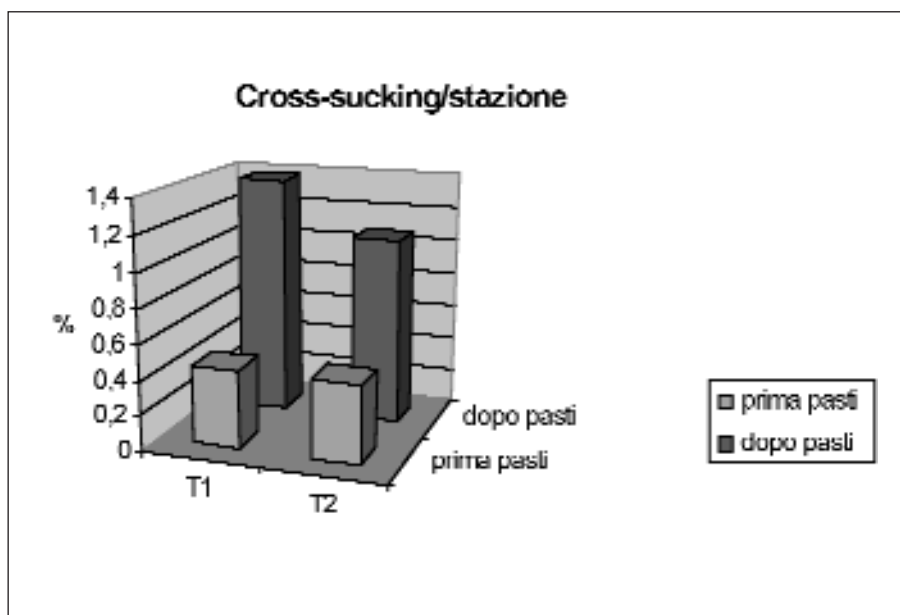


Fig. 6: Frequenze del comportamento “Cross-sucking prima e dopo i pasti.

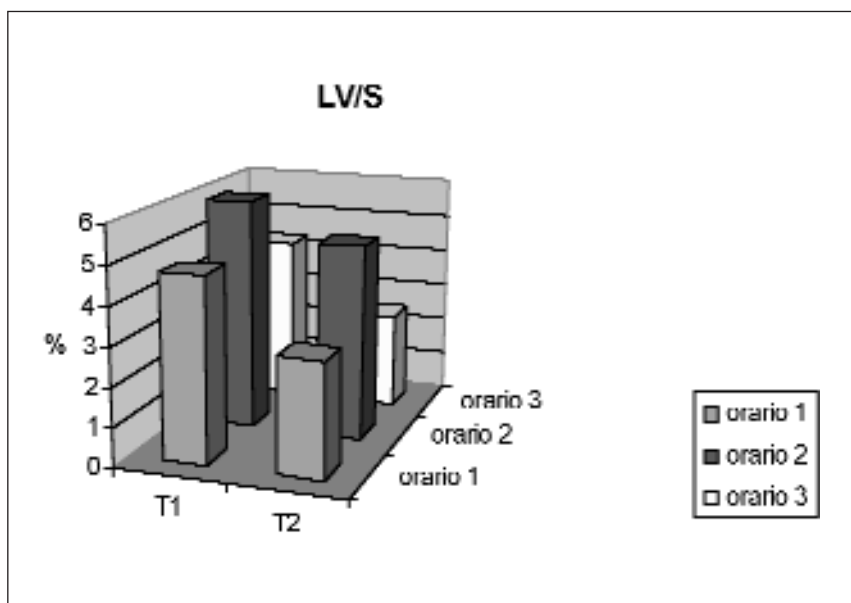


Fig. 7: Frequenze del comportamento “Lecca vitello in stazione” nel **Trattamento 1 e 2**, in funzione dell’orario.

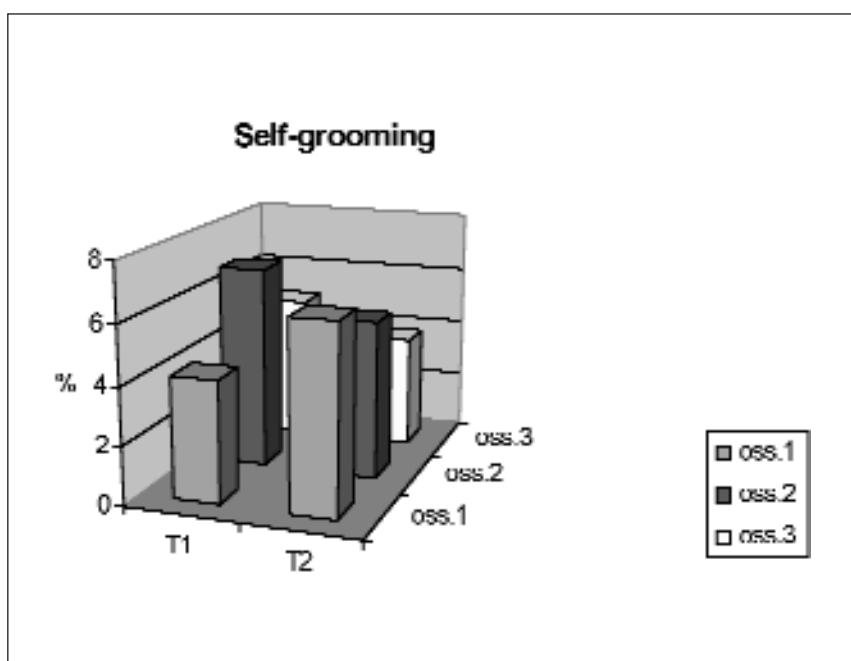


Fig. 8: Frequenze del comportamento “Self-grooming” nel **Trattamento 1 e 2**, in funzione del periodo di osservazione.

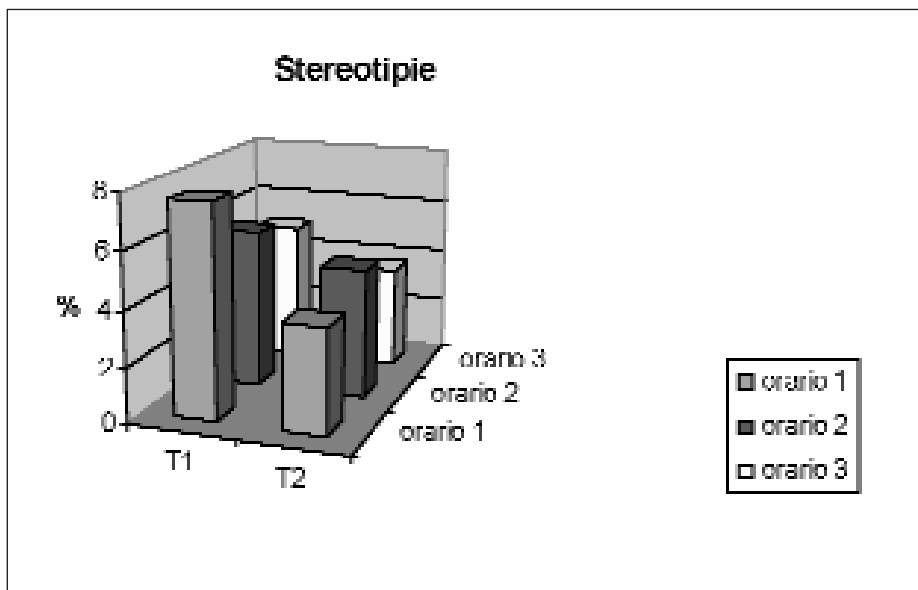


Fig. 9: Frequenze del comportamento "stereotipie" (TP+TR) nel **Trattamento 1 e 2**, in funzione dell'orario.

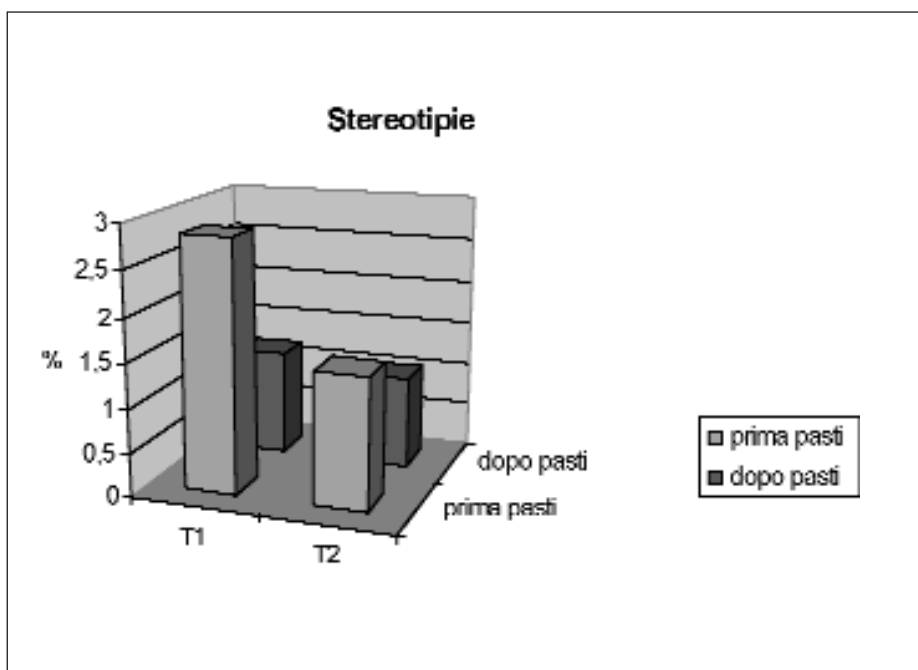


Fig. 10: Frequenze del comportamento "Stereotipia" prima e dopo i pasti.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ALBRIGHT J.L., STOFFER D.K., KENION N.J., 1991. *Behavior of veal calves in individual stall and group pens*. METZ J. H. M. e GROENESTEIN C.M. *New Trends in Veal Calf Production*. Wageningen: Pudoc, 44-48.
- 2) ALBRIGHT J. L., ARAVE C.W, 1997. *The Behaviour of Cattle*. CAB INTERNATIONAL, Oxon, UK.
- 3) AMADORI M, ARCHETTI I.L., FRASNELLI M., BAGNI M., OLZI E., CARONINA G., LANTERI M., 1997. *An immunological approach to the evaluation of welfare in holstein Frisian cattle*. *J. Vet. Med. B* 44, 321-327.
- 4) ANDRIGHETTO I, GOTTARDO F., ANDREOLI D., COZZI G., 1999. *Effect of type of housing on veal calf growth performance, behavior and meat quality*. *Livestock Production Science*, 57, 2, 137, 145.
- 5) BLACKSHAW J.K. & McVEIGHT J.F., 1984. *Stereotype behavior in sows and gilts housed in stall, tethers and groups*. In: *Advances in Animal Welfare Science*, 1984
- 6) BOKKERS E. A. M., KOENE P., 2001. *Activity, oral behaviour and slaughter data as welfare indicators in veal calves: a comparison of three housing systems*. *Applied Animal Behaviour Science* 75, 1-15.
- 7) BROOM D.M., 1983. *Stereotypies as animal welfare indicators*. In Smith D. (ed.), *Indicators Relevant to Farm Animal Welfare*. Martinus Nijhoff, The Hague, 81-87.
- 8) BROOM D.M., 1986. *Indicators of poor welfare*. *Br. Vet. J.* 142, 524-525.
- 9) BROOM D.M., JOHNSON K. G., 1993. *Stress and Animal Welfare*. Chapman & Hall, London, UK.
- 10) CANALI E., FERRANTE V., CARENZI C., VERGA M., 1998. *Stabulazione e management del vitello: criteri per la valutazione del benessere*. *Large Animals Review*. 4, 19-23.
- 11) CRONIN G.M., VAN TARTWIJK J.M.F., VAN DER HEL W. E VERSTEGEN M.W.A., 1986. *The influence of degree of adaptation to tether-housing by sow in relation to behavior and energy metabolism*. *Animal Production* 42, 257-268.
- 12) DE PASSILÈ A.M.B., METZ J.H.M., MEKKING P., WIEPKEMA P.R., 1992. *Does drinking milk stimulate sucking in young calves?* *Appl. Anim. Behav. Sci.* 34, 23-36.
- 13) DE PASSILÈ A.M., RUSHEN J., LADEWIG J., PETHERICK C., 1996. *Dairy calves' discrimination of people based on previous handling*. *J. Anim. Sci.* 74, 969-974.
- 14) DE PASSILÈ A.M., RUSHEN J., 1997. *Motivational and physiological analysis of the causes and consequences of non-nutritive sucking by calves*. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 53, 15-31.
- 15) DE WILT J.G., 1985. *Behaviour and welfare of veal calves in relation to husbandry systems*. Institute of Agricultural Engineering, Wageningen, The Netherlands.
- 16) DUNCHAN I.J.H., 1990. *Animal Welfare: What is it and how can we measure it? Paper presented to the Alberta Institute of Agrolgists, Edmonton, Alberta*.
- 17) EU SCIENTIFIC VETERINARY COMMITTEE, 1995. *Report on the welfare of calves* (Report on calf welfare 9/11 /95). Commission of the European Communities.
- 18) FRASER A.F., 1985. *Deprivation of maintenance behaviour in modern farm animal husbandry*. In: Fraser A.F. (Ed.), 1985. *Ethology of farm animals*. 377-389. Elsevier, Amsterdam.
- 19) FRASER A.F., BROOM D.M., 1990, *Farm animal behaviour and welfare*. Bailliere Tindall, London, U.K.
- 20) FRIEND T.H., DELLMEIER G.R., 1988. *Common practices and problems related to artificially rearing calves: an ethological analysis*. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 20, 47-62.
- 21) FUMAGALLI L., 1999. *Problematiche comportamentali rilevate nel vitello a carne bianca in differenti sistemi di allevamento*. Tesi di Laurea. Università degli Studi di Milano.
- 22) HOUPK K.A., 1998. *Domestic animal behavior for veterinarians and animal scientists* (III Ed.). Iowa State University Press, Ames, USA.
- 23) HUGHES B.O., 1976. *Behavior as an index of welfare*. Proceedings of 5° Europ Poultry Conference.

- 24) KILEY-WORTINGHTON M., 1977. *Behavioural problems of farm animals*. Oriel Press, London, U.K.
- 25) Lawrence A.B., Rushen J. 1993. *Stereotypic Animal Behaviour*. CAB International, Wallingford.
- 26) LE NEINDRE P., 1991. *Effects of breed and early social environment on calf behaviour*. In: *New trends in veal calf production*. Metz J.H.M. & Groenestein C.M. (Ed.), 1991. Pudoc, Wageningen.
- 27) LIDFORDS L.M., 1993. *Cross-sucking in group-housed dairy calves before and after weaning off milk*. Appl. Anim. Behav. Sci. 38, 15-24.
- 28) MARTIN P., BATESON P., 1986. *Measuring behaviour: an introductory guide*. Cambridge University Press.
- 29) MASON G.J., 1991. *Stereotypies: a critical review*. Anim. Behav. 41, 1015-1037
- 30) ÖDBERG F., 1978. *Abnormal behaviour (sterotypies)*, Introduction to the Round Table. In: *proceedings of the First World Congress of Ethology Applied to Zootechnics*, Madrid (Ed. Garsi), industrias graficas Espana, Madrid, 475-480.
- 31) REECE W.O. & HOTCHIKISS D.K., 1987. *Blood studies and performances among calves reared by different methods*. Journal of Dairy Science, 70: 1601-1611.
- 32) RUSHEN J., DE PASSILLE A. M., 1995. *The motivation of non-nutritive sucking in calves, Bos taurus*. Anim. Behav. 49, 1503-1510.
- 33) SALZEN E.A., 1990. *Emotion, empathy and suffering*. Brain Behaviour Sci., 13: 195-205.
- 34) SAS INSTITUTE INC., 1989. *SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth Edition, Volume 2*, Cary, NC, USA.
- 35) SATO S., NAGAMINE R., KUBO T., 1994. *Tongue-playing in tethered Japanese Black cattle: diurnal patterns, analysis of variance and behaviour sequences*. Appl. Anim. Behav. Sci. 39, 39-47.
- 36) Scan, 1995. *SCAN, software for chemometric analysis. Reference Manual. Release 1 for Windows*. Minitab Inc., U.S.A.
- 37) TOSI M., 1998. *Stereotipie orali nel vitello a carne bianca e metodologie di osservazione*. Tesi di Laurea. Università degli Studi di Milano.
- 38) VEISSIER I., RAMIREZ DE LA FE A.R., PRADEL P., 1998. *Nonnutritive oral activities and stress responses of veal calves in relation to feeding and housing conditions*. Appl. Anim. Behav. Sci. 57, 35-49.
- 39) VERGA M., CANALI E., FERRANTE V., MATTIELLO S., MONTI F., GOTTARDO F., COZZI G., ANDRIGHETTO I. 2000. *Somministrazione di un mangime solido a vitelli a carne bianca stabulati in gabbia individuale o in box di gruppo. 2. Parametri comportamentali, fisiologici e patologici*. Zootecnica e Nutrizione Animale 26 (6), 243-252
- 40) WIEPKEMA P.R., 1987, *Behavioural aspects of stress*. In: VON ANDRICHEM P.W.M. & WIEPKEMA P.R. (Ed.), *The Biology of Stress in Farm Animals: an Integrated Approach*. Martins (N.I.J. Roff, Dordrecht, 113-138.

GIULIO COZZI - FLAVIANA GOTTARDO
SONIA PRECISO
GIANLUCA FREGOLENT - IGINO ANDRIGHETTO

SIGNIFICATO DEI PARAMETRI ZOOTECNICI QUALI INDICATORI DI BENESSERE NEI BOVINI DA CARNE

Dipartimento di Scienze Zootecniche - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

PREMESSA

Condizioni non ottimali di allevamento rappresentate ad esempio da un insufficiente spazio per capo, dall'eccessivo affollamento nel gruppo o da una dieta sbilanciata comportano uno status di stress per i bovini da carne che, quando prolungato nel tempo, può incidere significativamente anche sulle performance produttive. Numerosi Autori (Siegel, 1987; Broom e Johnson, 1993) hanno dimostrato come queste cause di stress determinino un peggioramento dell'accrescimento, dell'indice di conversione alimentare e dello stato di salute degli animali per effetto di una diminuzione delle difese immunitarie. I parametri produttivi sono quindi correlati a condizioni di scarso benessere poichè aumenta la spesa energetica come risposta dell'animale ad una situazione non ottimale.

In condizioni sperimentali, protocolli di rilievo oramai consolidati consentono un regolare monitoraggio dei principali parametri produttivi (pesi vivi, consumi alimentari ecc.) che possono rappresentare un affidabile strumento per identificare le eventuali condizioni critiche di allevamento e correggerne le cause. Un simile approccio non appare invece applicabile da parte dell'Ispettore Veterinario nel momento in cui esso sia chiamato ad esprimere una valutazione dello stato di benessere degli animali durante un ordinario sopralluogo aziendale.

In quasi tutti gli allevamenti, comunque, sono disponibili informazioni che consentono di stimare con sufficiente precisione alcuni dei principali parametri di accrescimento degli animali, quali il peso medio di arrivo della partita, la durata del ciclo d'ingrasso, il peso vivo finale, la quantità di razione distribuita in mangiatoia, l'incidenza di patologie e dei conseguenti interventi terapeutici.

Il reperimento di questi dati può permettere il calcolo di alcuni importanti indicatori descrittivi dell'andamento del ciclo di crescita, come l'incremento ponderale medio giornaliero (peso finale – peso iniziale/giorni di allevamento), o l'indice di conversione (accrescimento giornaliero/consumo giornaliero di sostanza secca). Il confronto dei valori così ottenuti con i dati emersi da sperimentazioni scientifiche realizzate con soggetti della medesima categoria e tipo genetico, può rappresentare un valido supporto per valutare se quanto osservato in azienda soddisfa pienamente le attese. Qualora i risultati non fossero ottimali, sarà necessario procedere ad un attento monitoraggio delle condizioni di allevamento per individuare le specifiche carenze strutturali, nutrizionali, sanitarie e/o gestionali che abbiano compromesso il benessere degli animali e la conseguente risposta produttiva.

CARATTERISTICHE DELLE STRUTTURE DI ALLEVAMENTO E BENESSERE DEI BOVINI DA CARNE

La valutazione dello stato di benessere a livello aziendale non può prescindere dall'esame delle strutture di allevamento per accertare il rispetto dei requisiti minimi fissati dalla

legislazione vigente o indicati dal *report* redatto dal Comitato Scientifico Veterinario dell'Unione Europea (SCAHAW, 2001). Tali parametri sono oggettivamente misurabili dato che riguardano prevalentemente le strutture di stabulazione.

Nel caso del vitello a carne bianca, ad esempio, la normativa (direttive 97/2/Ce e 97/182/Ce) prevede che dal 31-12-2006 nessun vitello debba essere più legato alla catena o possa essere allevato in un recinto individuale, dopo le 8 settimane d'età. Le stesse norme hanno inoltre stabilito la superficie minima per capo allevato: i vitelli stabulati in box di gruppo avranno a disposizione 1.5 m²/capo fino ad un peso vivo di 150 kg, 1.7 m²/capo per un peso vivo compreso tra 150 e 220 kg e di 1.8 m²/capo per un peso vivo superiore a 220 kg.

Il fattore stabulazione si è dimostrato capace di influenzare la risposta produttiva degli animali. Vitelli allevati in box di gruppo manifestano un maggior accrescimento, specie nella seconda fase del ciclo d'ingrasso, quando lo spazio a disposizione nella gabbia individuale di tipo tradizionale diventa limitante e compromette la possibilità di movimento e di interazione sociale tra i soggetti (figura 1).

Lo stress da isolamento e da costrizione in uno spazio troppo angusto comporta quindi un consumo di energia superiore rispetto a quello derivante dall'attività motoria di vitelli allevati in box di gruppo. Lo stato di noia e frustrazione permanente che riguarda i soggetti in gabbia individuale è facilmente rilevabile anche per il forte interesse che questi manifestano per leccare, annusare e mordere le strutture (secchio, tettarella, pavimento, partizioni laterali, etc.) o alcune parti del loro stesso corpo, (gli arti anteriori in modo particolare).

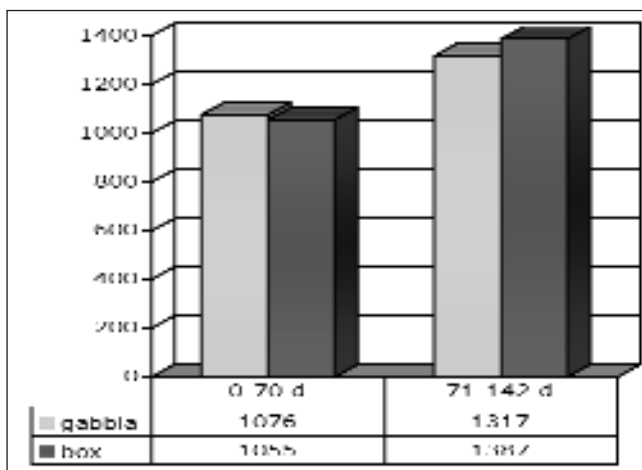


Figura 1: Accrescimenti medi giornalieri (g/d) di vitelli a carne bianca allevati in gabbia individuale o box di gruppo (Andrighetto e coll., 1999)

Nel caso dei vitelli allevati in box particolare attenzione deve essere rivolta verso l'adozione di sistemi di cattura degli animali durante la fase di distribuzione del latte. Bloccare gli animali alla posta durante l'assunzione della dieta previene, infatti, i fenomeni di competizione alimentare che favoriscono i soggetti di maggior mole a scapito dei più deboli, caratterizzati da un'ingestione più lenta. Anche l'utilizzo del truogolo, quale alternativa al secchio individuale non appare una soluzione consigliabile in quanto favorisce una ingestione disomogenea tra i diversi soggetti presenti nel gruppo. Il consumo regolare della prevista dose giornaliera di latte da parte dei vitelli è un fattore chiave per garantire le miglio-

ri condizioni di salute ma soprattutto per conferire una maggiore uniformità in peso e conformazione degli animali a fine ciclo.

La preferenza accordata dai produttori verso l'adozione del grigliato di cemento piuttosto che del legno per la pavimentazione dei box appare sconsigliabile in relazione al benessere del vitello. A fronte dei vantaggi di tipo economico e gestionale del cemento, la pavimentazione in legno garantisce certamente un maggior comfort termico soprattutto in presenza di basse temperature, cui questa categoria di bovini appare particolarmente sensibile. La rilevazione, durante il sopralluogo aziendale, di animali molto sporchi è riconducibile ad una inadeguata larghezza dei fori del grigliato sia esso in cemento o legno, che ostacola la percolazione di feci e urine.

Anche nel caso del vitellone da carne è possibile individuare alcuni requisiti minimi che l'ambiente di allevamento dovrebbe possedere a tutela del benessere degli animali. In assenza di norme specifiche, tali informazioni possono essere desunte dal recente *report* pubblicato dall'Unione Europea che ha preso in considerazione tutte le più aggiornate acquisizioni scientifiche in materia (SCAHAW, 2001). Sulla base della migliore risposta produttiva degli animali, questo documento ha proposto alcuni valori di riferimento per diversi parametri strutturali dell'allevamento quali lo spazio minimo per capo ($> 3 \text{ m}^2$), la disponibilità minima di fronte mangiatoia ($> 60 \text{ cm}^2/\text{capo}$), e il numero di capi da allevare entro lo stesso box (8-12).

Come per tutte le categorie di animali d'interesse zootecnico allevate secondo sistemi intensivi, anche nel bovino da carne la competizione per lo spazio è causa di un peggioramento delle performance produttive con una riduzione dell'accrescimento medio giornaliero (figura 2) e una perdita di efficienza nell'utilizzazione della razione. Una troppo limitata disponibilità di superficie/capo porta infatti ad una penalizzazione dei tempi di decubito e di riposo degli animali con una maggior spesa energetica.

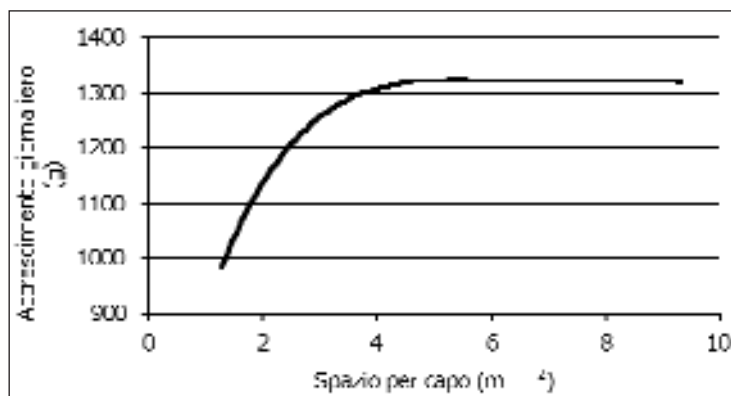


Figura 2: Accrescimento medio giornaliero in relazione alla disponibilità di spazio per capo (Ingvartsen e Andersen, 1993).

Una semplice valutazione visiva può permettere di controllare il grado di sviluppo dei capi stabulati all'interno di uno stesso box. La presenza di una marcata disomogeneità è quasi sempre indicativa di una notevole competizione soprattutto durante la fase di alimentazione. In numerosi centri d'ingrasso nazionali, scelte strutturali basate esclusivamente su

valutazioni di tipo economico, hanno portato alla costruzione di box di tipo rettangolare in cui il fronte mangiatoia viene posizionato molto spesso su uno solo dei due lati minori. Questa situazione, che si traduce nell'impossibilità per tutti gli animali presenti di visitare contemporaneamente la mangiatoia, aumenta la competizione e la conflittualità con ripercussioni negative nel consumo e nella conversione alimentare. Ogni soggetto presente nel gruppo dovrebbe poter avere sempre libero accesso alla zona di alimentazione, senza vincoli di tipo gerarchico o barriere strutturali.

Anche la scarsa disponibilità di cibo in mangiatoia può risultare una situazione che eleva la conflittualità entro gruppo a scapito del benessere degli animali. Molto spesso l'allevatore, con l'obiettivo di eliminare la presenza di residui di mangiatoia finisce per somministrare una quantità di dieta insufficiente a garantire la massima ingestione da parte di tutti i soggetti del box. La presenza di una quantità limitata di cibo stimola la competizione alimentare tra gli animali che sfocia spesso in manifestazioni violente tra soggetti di diverso rango gerarchico. Questa situazione può facilmente essere rilevata durante una ispezione aziendale, attraverso l'assenza di una certa quota di alimento residuo in mangiatoia (3-5%) prima della distribuzione quotidiana della dieta.

Così come per il vitello a carne bianca, anche nel caso del vitellone il tipo di pavimentazione è un fattore determinante per garantire il benessere dei bovini da carne. L'allevamento su lettiera permanente viene comunemente associato ad un maggiore comfort, in quanto favorisce la corretta manifestazione del repertorio comportamentale che l'animale manifesta nel passaggio dal decubito alla stazione e viceversa. La lettiera inoltre, rispetto al grigliato agevola il movimento del bovino e limita i casi di scivolamento, con minori percentuali di capi macellati d'urgenza per problemi agli arti.

I vantaggi sopra citati per questo tipo di pavimentazione possono tuttavia essere persi quando il ricambio del substrato che costituisce la lettiera risulti insufficiente. In questo caso, la pavimentazione è molto umida e può diventare un *pabulum* ideale per lo sviluppo microbico. In sede ispettiva, un rapido giudizio sulla qualità della lettiera può essere espresso valutando lo stato di pulizia dei bovini. E' infatti evidente che se la frequenza di rinnovo è insufficiente gli animali saranno abbondantemente imbrattati di feci a livello degli arti e dell'addome.

L'adozione della pavimentazione a grigliato ha risolto il problema dell'approvvigionamento del materiale impiegato per la lettiera. Non sempre però, le soluzioni proposte hanno considerato con attenzione le esigenze dei bovini, risultando spesso addirittura pericolose. Un grigliato troppo scivoloso limita la locomozione e porta gli animali ad interrompere la sequenza naturale di movimenti da effettuare per coricarsi (appoggio a terra degli arti posteriori prima di quelli anteriori, Tabella 1).

Tabella 1: Frequenza (percentuale) delle diverse modalità di comportamento adottate per raggiungere il decubito in vitelloni su lettiera (n = 2130) o su grigliato (n = 1129). Da Andreae e Smidt (1982), modificato.

	<i>Tipo di pavimentazione</i>	
	<i>Lettiga permanente</i>	<i>Grigliato</i>
<i>Decubito normale</i>	95.1	60.0
<i>Intenzione al decubito interrotta</i>		
- una volta	4.2	22.0
- 2 - 4 volte	0.3	8.0
<i>Decubito con arti posteriori</i>	0.3	8.3

Anche la condizione opposta, rappresentata da un grigliato eccessivamente abrasivo, deve essere considerata negativamente in quanto sottopone gli unghioni dell'animale ad una usura eccessiva che può favorire una maggiore incidenza delle patologie del piede dovuta ad una insufficiente protezione delle parti molli.

Nell'allevamento intensivo, l'elevata densità dei bovini in presenza di una insufficiente ventilazione può portare ad un progressivo inquinamento dell'aria nei locali di stabulazione fino a pregiudicare il benessere degli animali stessi. Il microclima ambientale inteso come temperatura, umidità relativa dell'aria, concentrazione di anidride carbonica (CO₂), metano (CH₄) ed in particolare per il vitello a carne bianca il livello di ammoniaca (NH₃), può modificarsi fino a raggiungere valori in grado di compromettere la salute dei soggetti allevati. Concentrazioni di anidride carbonica (CO₂) e ammoniaca (NH₃) rispettivamente superiori a 5000 ppm e 20 ppm si sono dimostrate nocive per il bovino (SCAHAW, 2001). In questo senso l'inserimento di impianti di aspirazione nei ricoveri rappresenta sicuramente un vantaggio per l'animale soprattutto durante il periodo invernale.

Un ulteriore fattore che viene normalmente trascurato negli ambienti di allevamento è l'illuminazione. Una buona luminosità della stalla, infatti, consente un maggior controllo dell'animale nei confronti dell'ambiente circostante e una migliore interazione sociale tra i componenti del gruppo con la conseguente riduzione dello stress.

STATO DI SALUTE E BENESSERE DEI BOVINI DA CARNE

Condizioni di stress prolungato possono influire negativamente sull'efficienza del sistema immunitario traducendosi in una maggiore suscettibilità dell'animale ad ammalarsi. In linea generale, la rilevazione di dati come il numero di trattamenti sanitari, il tasso medio annuale di mortalità e l'incidenza delle macellazioni d'urgenza, possono essere dei buoni indicatori dello stato di salute dei bovini.

Secondo quanto riportato nel documento redatto dallo SCAHAW (2001) alcune condizioni strutturali presenti negli allevamenti di bovini da carne possono influenzare lo stato di salute dei vitelloni. Quando la superficie per capo è inferiore ai 3 m² la mortalità è superiore all'1% e può raggiungere anche il 2% con meno di 2.5 m²/capo. Lo stesso documento, che riporta i dati dell'Istituto de l'Élevage Francese (ITEB, 1983), evidenzia come il pavimento in cemento aumentando i casi di scivolamento, sia una delle principali cause d'insorgenza di problemi agli arti (36% contro il 14% della lettiera) e di eliminazione precoce degli animali (1.8% contro lo 0.7% della lettiera).

Anche il regime alimentare può condizionare lo stato di salute degli animali. I dati di una recente indagine condotta in allevamenti di vitelloni (Gottardo e coll., 2002) hanno sottolineato la scarsa attenzione riposta verso il razionamento del bovino da carne con una pratica abbastanza generalizzata orientata verso l'uso eccessivo di concentrati energetici e proteici con l'obiettivo di massimizzare le performance di crescita. Diete squilibrate ed in particolare carenti in fibra sono la principale causa dell'acidosi ruminale, tecnopatia ampiamente diffusa nel vitellone. A livello aziendale, l'acidosi viene controllata con un largo uso di sostanze ad azione tampone che evitano una caduta del pH ruminale fino a valori patologici. Frequenti, però, sono le situazioni in cui la condizione di acidosi risulta subclinica e pur non sfociando in una patologia conclamata può favorire la manifestazione di accessi epatici, laminiti e necrosi della coda.

Nel caso specifico del vitello a carne bianca l'obiettivo di ridurre al minimo la manodopera, anche attraverso l'introduzione di sistemi automatizzati di alimentazione, ha portato ad una significativa riduzione dei tempi di interazione tra l'operatore di stalla e gli animali. In

questo modo si osserva una crescente diffidenza e paura del vitello nei confronti dell'uomo, soprattutto quando questo opera in modo poco "amichevole" con pratiche violente fisiche e verbali. La manifestazione di questo panico da parte dell'animale emerge soprattutto al momento della movimentazione verso il camion per il trasporto al macello con una iperreattività comportamentale con un aumento del ritmo cardiaco e respiratorio (Lensink e coll., 2001). Al macello, lo stress subito in queste specifiche fasi di movimentazione può condizionare la qualità finale della carne attraverso una maggiore incidenza di casi di DFD (carni secche, dure e scure). Le carni provenienti da animali stressati sono ipoacide ($\text{pH} > 5.9$) ed appaiono meno luminose (vitello $L^* < 50$; vitellone $L^* < 38$) e più scure. Questa alterazione è legata ad una carenza di glicogeno muscolare che limita la caduta di pH post mortem (Guignot e coll., 1994). L'adrenalina prodotta dalle ghiandole corticosurrenali come risposta fisiologica allo stress è responsabile dell'aumento della frequenza cardiaca ed incide negativamente sulle riserve di glicogeno (Voisinet e coll., 1997).

Sempre negli allevamenti di vitelli a carne bianca, particolare attenzione dev'essere rivolta al controllo dei livelli di emoglobina. Lo specifico programma di alimentazione adottato per questa categoria di animali, basato sulla somministrazione di sostitutivi del latte a basso contenuto in ferro, può portare alla manifestazione di problemi di anemia nel corso del ciclo di allevamento. Un vitello anemico risulta debole e manifesta fenomeni di rifiuto del latte, associati a diarrea. Il problema del livello di emoglobina è stato affrontato anche dalla direttiva dell'Unione Europea 97/2 Ce che ha fissato una concentrazione minima per il vitello a carne bianca pari a 7.25 g/dl.

Controlli regolari a scadenza mensile del livello di emoglobina nel sangue sono quindi necessari per prevenire la carenza di ferro e approntare un piano di interventi mirato per gli animali "problema". Il dosaggio del ferro da somministrare sarà valutato considerando che il calo fisiologico di emoglobina nel corso del ciclo d'ingrasso, con il regime alimentare tradizionale, è di circa una unità (1 g/dl) al mese e che alla macellazione la concentrazione ottimale deve essere inferiore ad 8 g/dl. In figura 3 è riportato il trend di diminuzione del livello di emoglobina in vitelli allevati secondo il sistema tradizionale.

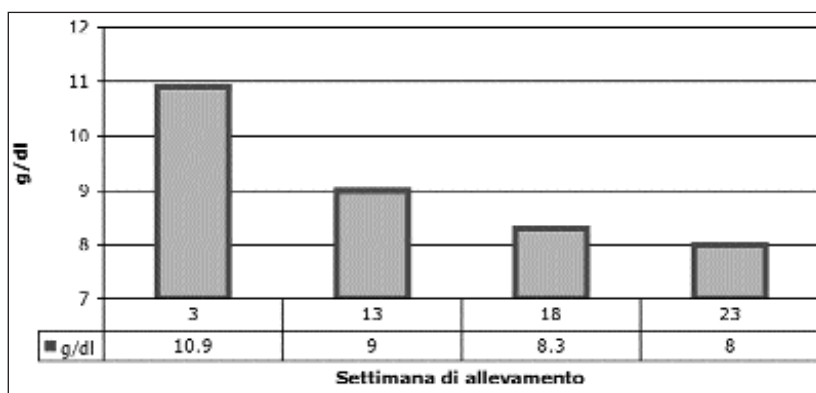


Figura 3: Andamento nel corso del ciclo di allevamento del livello di emoglobina (g/dl) in vitelli a carne bianca. Da Cozzi e coll. (2002), modificato.

Anche semplici osservazioni comportamentali possono essere utili per individuare problemi di ferro carenza nei vitelli; i soggetti anemici infatti cercano di approvvigionarsi del minerale leccando continuamente le strutture di stabulazione.

Un altro indicatore di un buono stato di salute per il vitello a carne bianca è rappresentato dall'aspetto e dalla consistenza delle feci che indirettamente possono fornire informazioni a riguardo del funzionamento dell'apparato gastro-intestinale. Nei vitelli alimentati esclusivamente con sostitutivi del latte, le feci sono chiare, poco consistenti e non devono contenere sangue e/o coaguli di latte indigerito. La somministrazione di quantità modeste di alimenti solidi soprattutto fibrosi, secondo la nuova normativa sul benessere del vitello, favorisce una produzione di feci di maggior consistenza.

CONCLUSIONI

Accanto ai più sofisticati indicatori fisiologici ed etologici anche le prestazioni produttive in vivo possono rappresentare un valido supporto per esprimere un corretto giudizio sullo stato di benessere di vitelli e vitelloni da carne. La risposta produttiva dell'animale appare molto sensibile alle condizioni di allevamento ed anche situazioni non estreme possono ripercuotersi significativamente sul consumo alimentare e sulla performance di crescita.

Unitamente all'analisi di questi indicatori, sono stati proposti tutta una serie di rilievi sulle strutture aziendali o relativi al microclima presente nei locali di allevamento che possono identificare situazioni non ottimali in grado di condizionare lo stato di benessere degli animali. Tutte queste misure, di tipo non invasivo, non richiedono infatti al momento della loro esecuzione alcuna movimentazione e/o manipolazione degli animali ed appare probabile che in un prossimo futuro vengano definiti più specifici valori di riferimento in relazione ai diversi tipi genetici allevati.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ANDREAE U., SMIDT D. (1982) – *Behavioural alterations in young cattle on slatted floors*. In: Bessei W. (ed.) *Disturbed Behaviour in Farm Animals*. Eugen Ulmer, Stuttgart, D.
- 2) ANDRIGHETTO I., GOTTARDO F., ANDREOLI D., COZZI G. (1999) – *Effect of type of housing on veal calf growth performance, behaviour and meat quality*. *Livestock Production Science*, 57: 137-145.
- 3) BROOM D.M., JOHNSON K.G. (1993) – *Stress and Animal Welfare*. Chapman & Hall, London, UK.
- 4) COZZI G., GOTTARDO O F., MATTIELLO S., CANALI E., SCANZIANI E., VERGA M., ANDRIGHETTO I. (2002) – *The provision of solid feeds to veal calves: I. Growth performance, forestomach development, carcass and meat quality*. *Journal of Animal Science*, 80: 357-366.
- 5) GOTTARDO F., FREGOLENT G., PRECISO S., COZZI G., RAGNO E., BIANCHI C., MAZZINI C., ANDRIGHETTO I. (2002) – *Il benessere dei bovini allevati per la produzione di carne*. *L'informatore Agrario*. 58 (6): 35-39.
- 6) GUIGNOT F., TOURAILLE C., OUALIA., RENNERRE M., MONIN G. (1994) – *Relationships between post-mortem pH changes and some traits of sensory quality in veal*. *Meat Science*, 37: 315-325.
- 7) INGVARSEN K.L., ANDERSEN H.K. (1993) – *Space allowance and type of housing for growing cattle*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A, Animal Science*, 43: 65-80.
- 8) ITEB (1983) – *Le taurillon*, ITEB, Paris, F.
- 9) LENSINK B.J., FERNANDEZ X., COZZI G., FLORAND L., VEISSIER I. (2001) – *The influence of farmers' behaviour on calves' reactions to transport and quality of veal meat*. *Journal of Animal Science*, 79: 642-652.

- 10) SCAHAW - *Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare* (2001) - *The welfare of cattle kept for beef production*. 25 April 2001. SANCO.C.2/AH/R22/2000, http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scah/outcome_en.html
- 11) SIEGEL H.S. (1987) – *Effects of behavioural and physical stressors on immune responses*. In: Wiepkema P.R. e van Adrichem P.W.M. (eds.) *Biology of Stress in Farm Animals, Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, 42: 39-54.
- 12) VOISINET B.D., GRANDIN T., O'CONNOR S.F., TATUM J.D., DEESING M.J. (1997) - *Bos Indicus-cross feedlot cattle with excitable temperaments have tougher meat and a higher incidence of borderline dark cutters*. *Meat Science*, 46: 367-377.

SCANZIANI E., LUINI M.*

RUOLO DEI RILIEVI ISPETTIVI AL MACELLO NELLA VALUTAZIONE DEL BENESSERE NELLA SPECIE BOVINA

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Sezione di
Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano
* Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Sezione Diagnostica di Lodi

Il benessere, secondo la definizione di Hughes (1976), è uno stato di salute completa, sia fisica che mentale, in cui l'animale è in armonia con il suo ambiente. Da tale definizione deriva l'importante relazione esistente tra benessere animale e patologia, relazione che può essere considerata sotto diversi punti di vista.

In primo luogo esistono situazioni nelle quali lo stato di non benessere è responsabile dello sviluppo di lesioni secondarie peculiari. Un classico esempio è l'ulcera gastrica. In questo caso stress fisici o psichici, attraverso l'asse ipotalamo-ipofisario, inducono una elevata produzione di corticosteroidi da parte del surrene. I corticosteroidi sono responsabili di un aumento della secrezione gastrica con conseguente sviluppo di ulcere peptiche (Guarda e Mandelli, 2001).

Un'altra possibilità è quella legata a fattori che sono in grado di operare contemporaneamente uno stato di non benessere e lesioni. Tra questi fattori i più importanti sono i traumi di diversa natura che possono essere inferti da altri animali, dall'uomo o derivanti dal contatto con le strutture di allevamento. Lesioni di natura traumatica sono rilevabili con estrema frequenza negli animali da macello a livello cutaneo. Esse sono riconducibili a soluzioni di continuo (tagli, incisioni, lacerazioni, perforazioni) provocate da corpi appuntiti, taglienti o abrasivi oppure a lesioni caratterizzate da una scarsa tendenza alla guarigione indotte da una blanda ma cronica azione traumatica (callosità, piaghe). Non vanno comunque dimenticate le lesioni provocate da traumi ottusi localizzate in profondità e con cute generalmente integra.

Lo stato di non benessere può essere anche considerato come fattore predisponente nello sviluppo di patologie. Ad esempio, condizioni ambientali sfavorevoli dell'allevamento (temperatura elevata o troppo bassa, presenza di polveri e/o elevata concentrazione di ammoniaca nell'aria) rappresentano importanti fenomeni predisponenti nello sviluppo di patologie dell'apparato respiratorio quali riniti e polmoniti.

Infine va considerato come una patologia possa essa stessa rappresentare una causa di non benessere. Esistono numerose patologie a carattere cronico (ad esempio broncopolmoniti catarrali) che interessano con alta prevalenza i bovini da macello e che possono indurre uno stato di non benessere di lunga durata negli animali colpiti.

I rilievi ispettivi eseguiti in sede di macellazione, oltre ad essere finalizzati al giudizio sulla singola carcassa, rappresentano una fonte importantissima di informazioni nei riguardi dello stato di salute e di benessere del singolo animale o meglio di un gruppo di animali proveniente da un determinato allevamento. Lo stato di non benessere può infatti manifestarsi attraverso anomalie di tipo comportamentale/clinico che possono essere rilevate alla visita sanitaria *ante mortem* ed anche attraverso alterazione morfologiche di tessuti/organi (lesioni) che possono essere rilevate alla visita sanitaria *post mortem*. Talvolta, lesioni riconducibili a situazione di non benessere tendono a permanere per lungo tempo nell'animale (ad esempio callosità) o a lasciare segni permanenti (ad esempio cicatrici): tali lesioni sono quindi facilmente e frequentemente rilevabili in sede di macellazione.

La corretta interpretazione eziopatogenetica di lesioni riscontrabili alla macellazione non sempre risulta agevole. Ad esempio può essere considerato il fenomeno ulcera gastrica che, come più sopra ricordato, può derivare da stress fisici e psichici ma anche da una lunga serie di altri fattori quali: disturbi di circolo, infezioni virali, infezioni batteriche, infezioni fungine, parassiti, errori dietetici, ecc. (Guarda e Mandelli, 2001). Ancora, il ruolo di batteri del genere *Helicobacter* nella genesi dell'ulcera gastrica dell'uomo e di alcuni animali è stato chiarito (Crippa, 1995). Infine, in una recente ricerca la presenza di ulcere abomasali in vitelli da latte è stata correlata all'introduzione, nella dieta, di fibra sotto forma di frammenti di paglia in grado di esercitare una azione traumatica diretta sulla mucosa abomasale (Mattiello, in corso di stampa).

Lesioni osservabili al macello possono essere correlate a problemi occorsi durante la vita produttiva trascorsa in allevamento ma anche a 2 momenti particolarmente critici nei riguardi del benessere animale: il trasporto dall'allevamento al macello e la macellazione vera e propria. A questo riguardo è molto importante una corretta valutazione delle lesioni che si osservano alla visita sanitaria *post mortem* allo scopo di datare con precisione il momento in cui tali lesioni si sono instaurate. Tale valutazione può essere fatta macroscopicamente o, in modo ancor più dettagliato, istologicamente. Ad esempio, in uno studio condotto su vitelli da latte sono state considerate le lesioni istologiche abomasali (erosioni e ulcere in particolare) eventualmente correlabili ad uno stato di non benessere. Accanto al rilievo di lesioni ulcerative a carattere subacuto/cronico (che si sono sicuramente sviluppate durante il periodo trascorso in allevamento) sono state osservate lesioni necrotico/erosivo a carattere iperacuto databili nei termini di 12-24 ore corrispondenti quindi al periodo di carico e trasporto dall'allevamento al macello (Mattiello, in corso di stampa). Viene riportata in tabella 1 un elenco di elementi rilevabili istologicamente a diversi tempi in tessuti danneggiati in corso di riparazione.

Il trasporto degli animali da macello, che può comportare spostamenti di centinaia o addirittura migliaia di chilometri, deve avvenire in condizioni che garantiscano il benessere degli animali. Esse sono richiamate da un apposito riferimento legislativo (Decreto Legislativo n° 532 del 30/12/92: Protezione degli animali durante il trasporto). Questo decreto rappresenta la principale norma che regola questo settore molto importante sia per ragioni etiche, nel senso di evitare agli animali inutili sofferenze, che commerciali. E' noto infatti che animali affaticati, feriti, malati producano carni di scarsa qualità. La norma legislativa risulta piuttosto particolareggiata: per esempio prevede che, in caso di viaggio della durata superiore alle ore 24, il responsabile dell'azienda di trasporto deve stabilire in anticipo l'itinerario con i necessari punti di sosta per il riposo, l'alimentazione e l'abbeverata degli animali. Gli animali che si ammalano o si feriscono durante il viaggio devono essere opportunamente curati o sottoposti a macellazione d'urgenza, allo scopo di evitare loro sofferenze inutili. Il trasporto rappresenta inoltre un fattore stressante per gli animali in grado di favorire o determinare particolari patologie che possono essere rilevate all'arrivo degli animali al macello (tabella 2). E' compito del veterinario ispettore verificare l'osservanza delle norme sul benessere animale, in particolare riferite al trasporto, all'atto della visita ante mortem. Animali stanchi, agitati o con malattie reversibili devono essere sottoposti a macellazione differita. Un segno rilevabile alla visita ispettiva post mortem indicativo di disagiate condizioni legate al trasporto è la stasi acuta splenica, lesione comune e caratteristica del bovino denominata, proprio in riferimento alle cause sopra citate, "milza da strapazzo".

La macellazione rappresenta un punto critico per quanto riguarda la protezione degli animali. Sono state emanate specifiche norme atte a garantire la protezione degli animali avviati alla macellazione. Una prima norma a carattere più generale (Legge 473 del 22/11/93) intitolata "Norme contro il maltrattamento degli animali" integra il codice penale, sostituendone l'articolo 727. Il nuovo articolo punisce "Chiunque incrudelisce verso animali

senza necessità o li sottopone a strazi e servizie o a comportamenti e fatiche insopportabili per le loro caratteristiche.....”. Una seconda norma (Legge 623 del 14/10/85) ratifica ed esegue la Convenzione Europea sulla Protezione degli animali da allevamento e da macello. La convenzione si applica a tutte le specie di animali da macello ed a tutte le fasi della macellazione (scarico, avviamento al recinto del mattatoio, ricovero degli animali, immobilizzazione, stordimento, abbattimento). Lo scopo di questa convenzione è già evidente con l’introduzione della definizione di stordimento: ogni procedimento che riduca l’animale in stato di incoscienza, nel quale viene mantenuto fino alla sua morte, risparmiandogli in ogni caso qualsiasi sofferenza evitabile. Una caratteristica lesione del bovino rilevabile alla visita ispettiva post mortem indicativo di una non corretto stordimento è la presenza di gravi e diffuse emorragie sub-endocardiche: il rilievo di questa alterazione deve indurre il veterinario ispettore ad un immediato e attento controllo delle procedure di stordimento. Nella convenzione vengono enunciate le regole generali da applicare in ogni fase del processo di macellazione.

Quali considerazioni conclusive si può dire che, tradizionalmente, il veterinario ispettore si è solo tangenzialmente preoccupato delle problematiche legate al benessere animale. La crescente sensibilità nei confronti di tali problematiche deve promuovere un cambiamento nella mentalità del veterinario ispettore che, per la sua specifica competenza professionale, rappresenta a livello di macello, la figura più qualificata nel vigilare l’osservanza delle norme legate al benessere animale. Oltre ad una attenta vigilanza sulle procedure di macellazione il veterinario ispettore, attraverso il rilievo sistematico delle patologie e alla loro datazione, può ottenere importanti informazioni sullo stato di benessere di un gruppo di animali e fornire valide indicazioni per un intervento correttivo.

Tab 1 - Presenza di elementi cellulari e tissutali rilevabili istologicamente in un processo riparativo in riferimento al tempo

<i>Sangue</i>	1 ora
<i>Granulociti</i>	2 ore
<i>Macrofagi, fibroblasti, fibre reticolari</i>	3 giorni
<i>Gemmazione dei capillari</i>	5 giorni
<i>Linfociti, cellule giganti, fibre collagene</i>	7 giorni
<i>Canalizzazione dei capillari</i>	8 giorni
<i>Plasmacellule</i>	10 giorni
<i>Fibre elastiche</i>	4 settimane
<i>Birifrangenza delle fibre collagene</i>	3 mesi

Tab. 2 - Principali patologie indotte dal trasporto degli animali

Sindrome da stress del suino (Porcine Stress Syndrome - PSS)
Miodistrofia enzootica
Colpo di calore
Insufficienza cardio-circolatoria
Shipping fever
Tetania da trasporto
Traumi

BIBLIOGRAFIA

- 1) CRIPPA L., GIUSTI A.M., SCANZIANI E., GOBBI A., MONZEGLIO M.G. (1995) *Helicobacter*: "nuovi" microrganismi dell'apparato digerente degli animali. *Summa*, 8: 35-39.
- 2) GUARDA F., MANDELLI G. (2001) *Trattato di Anatomia-patologica Veterinaria*. III ed., UTET, Torino.
- 3) HUGHES B.O. (1976) *Behaviour as an index of welfare*. Proc. V Europ Poultry Conf., 1005-1018.
- 4) MATTIELLO S., CANALI E., FERRANTE V., CANIATTI M., GOTTARDO F., COZZI G., ANDRIGHETTO I., VERGA M. (in corso di stampa) *The provision of solid feeds to veal calves: II. Behavior, physiology, and abomasal damage*. *J. Animal. Sci.*

LE ANALISI DI LABORATORIO

ARCHETTI I.L., RAVAROTTO L.*

Reparto Benessere Animale Immunoprofilassi, IZSLER, Brescia
* Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche, IZSVE, Padova

PRELIEVO E PROCESSAZIONE DEI CAMPIONI DI SANGUE

A) PRELIEVO

Analisi chimico-cliniche ed esame emocromocitometrico

Eseguire il prelievo dall'animale in provetta con LITIO EPARINA (analisi chimico - cliniche) o K₃EDTA (esame emocromocitometrico).

Eseguire il prelievo al mattino prima della foraggiata se nell'azienda viene utilizzato l'unifeed. Nel caso in cui i bovini non siano alimentati con l'unifeed, prelevare il sangue sempre al mattino a distanza di almeno 9 ore dall'inizio dell'ultimo pasto.

Prelevare il sangue dalla giugulare. Per il microematocrito entrambi i tipi di provette possono andar bene. I prelievi effettuati dai vasi della coda non sono idonei in quanto vi è la possibilità di commistione fra sangue venoso e arterioso.

Immunologia Clinica

Disinfettare la cute dell'animale.

Prelevare il sangue mediante provette vacutainer (una con EDTA ed una senza anticoagulante) in modo da riempirle completamente.

Norme generali

Nelle campionature su siero non agitare la provetta (in modo da evitare l'emolisi).

Nelle campionature in cui è richiesto l'anticoagulante, subito dopo aver effettuato il prelievo, invertire delicatamente più volte la provetta in modo che il sangue non coaguli. E' bene, inoltre, che la provetta contenente anticoagulante sia riempita in modo idoneo (fino al limite indicato sulla stessa). Per le bovine da latte, ogni richiesta di analisi deve essere accompagnata dalla indicazione, per ogni animale, della fase di lattazione (data ultimo parto) e del numero di parti. Tali informazioni risultano indispensabili per poter fornire dei valori di riferimento adeguati per le analisi richieste. In generale si consiglia di fornire dettagliate informazioni anamnestiche relative al caso in esame, qualsiasi sia la categoria zootecnica sottoposta a campionamento.

Modalità e tempi di consegna

Il campione deve essere consegnato al laboratorio il prima possibile, preferibilmente entro 6 ore dal prelievo.

Refrigerare i campioni durante il trasporto (non congelare).

B) PROCESSAZIONE

Analisi chimico-cliniche

All'arrivo in laboratorio i campioni devono essere subito centrifugati a + 4°C per 20 minuti a 3000 rpm. Conservare quindi il plasma a -20°C in due aliquote da almeno 1,0 ml circa per ciascun campione; se la quantità di plasma ottenuta dovesse essere insufficiente, ridurre i volumi a 0,5 ml evitando attentamente di non aspirare la parte corpuscolata. Eventualmente filtrare con filtri di separazione (Roche Seraclear). Prima dell'analisi si scongela il plasma a 37°C per 10 min. in bagno termostato, dopodiché lo stesso viene miscelato per alcuni secondi su Vortex evitando accuratamente la formazione di schiuma.

Immunologia Clinica (C', lisozima, battericidia, aptoglobina, elettroferogramma)

Dopo la separazione del coagulo, centrifugare il campione per 20' a 2500 rpm a 4°C e conservare il siero in quattro aliquote da 500 µl ciascuna a -80°C, se non è possibile l'esecuzione immediata dei test (-20°C per l'elettroforesi delle sieroproteine).

Tabella riassuntiva

Campione	Preparazione e conservazione (consegna diretta al laboratorio)	Invio da altro laboratorio
<i>Plasma in Litio eparina per chimica clinica</i>	Centrifugare per 20' a + 4°C a 3000 rpm	Due aliquote di plasma da 1,0 ml congelate a -20°C
<i>Siero per elettroforesi</i>	Centrifugare a 2500 rpm a + 4°C per 20 minuti	Due aliquote di siero da 0,5 ml congelate -20°C
<i>Siero per Immunologia Clinica</i>	Centrifugare a 2500 rpm a + 4°C per 20 minuti	Quattro aliquote di siero da 500 µl congelato a -80°C trasportato in ghiaccio secco
<i>Sangue intero in K₃EDTA per emocromo o microematocrito</i>	Non necessita di preparazione conservare a +4°C	Spedizione in giornata in condizione di refrigerazione

VALORI NORMALI DI RIFERIMENTO DI ALCUNI PARAMETRI
EMATICI NELLA SPECIE BOVINA UTILIZZATI DAL LABORATORIO
DI BIOCHIMICA CLINICA IZSLER, BRESCIA

Parametri	Unità misura	Bovini adulti	Bovini fino a 6 mesi
<i>Proteine sieriche</i>	g/l	50-80	50-65
<i>Rapporto Albumine/ Globuline</i>	-	0,75-0,90	0,75-1,0
<i>α-globuline</i>	g/l	7,5-8,8	7,5-8,8
<i>β-globuline</i>	g/l	8-11,5	8-11,5
<i>γ-globuline</i>	g/l	16,9-25,0	10-20
<i>Aptoglobina</i>	HbBC mg/dL	<10	<10
<i>Complemento</i>	C'H ₅₀ /150 μl	≥30	≥20
<i>Lisozima sierico</i>	μg/ml	1-3	1-3
<i>Attività battericida sierica</i>	%	>90	*
<i>Blastizzazione con mitogeni**</i>	cpm	≥750	≥750
<i>RBC</i>	x10 ⁶ /μl	5-10	8,5-10,5
<i>WBC</i>	x10 ³ /μl	4-12	7,6-13,7
<i>Hgb</i>	g/l	80-150	97-127
<i>Hct</i>	%	24-46	24-46
<i>MCV</i>	fl	40-60	34-41
<i>PLT</i>	x10 ³ /μl	100-800	100-800
<i>MCH</i>	pg	11-17	10-13
<i>MCHC</i>	%	26-34	26-34
<i>Cellule Mononucleate</i>	%	55-70	55-70

* Test non eseguibile

** Test con Conavalina A su sangue in toto prelevato in K₃EDTA; lettura su gas counter

AMADORI M., ARCHETTI I.L.

IMMUNOLOGIA CLINICA

Reparto Benessere Animale Immunoprofilassi, IZSLER, Brescia

TITOLAZIONE DEL LISOZIMA

PREMESSA

La titolazione del lisozima viene effettuata nel siero di sangue prelevato con provetta vacutainer dalla vena giugulare del bovino. Il lisozima (muramidasi, N-acetil-muramil-idrolasi) è un potente enzima antibatterico a diffusione pressochè ubiquitaria, in grado di svolgere anche una azione sinergica con la risposta immunitaria umorale e i fattori del complemento. La sua determinazione ci fornisce informazioni sullo stato di attivazione del sistema monocitario-macrofagico e sulla presenza di stati flogistici. In alternativa alla procedura qui descritta è pure disponibile un kit commerciale.

PRINCIPIO

Il campione di siero viene messo a contatto con un microrganismo sensibile all'attività litica del lisozima incorporato in un gel di agar. La presenza del lisozima verrà evidenziata, dopo un opportuno periodo di incubazione, dalla comparsa di un alone di lisi del germe attorno al pozzetto di deposizione del campione. La concentrazione del lisozima sarà proporzionale al diametro dell'anello di chiarificazione osservabile attorno al pozzetto e verrà stabilita in base ad una curva standard ottenuta incubando quantità di lisozima note.

STRUMENTAZIONE E MATERIALE

Termostato a temperatura fissa di +37°C	Micropipette a volume variabile.
Frigorifero	Pipettatrice automatica
Congelatore a temperatura inferiore o uguale a -20°C	pH-metro
Congelatore a temperatura inferiore a -70°C	Centrifuga da banco per provette
Pompa da vuoto	Agitatore elettromagnetico con riscaldamento
Agitatore per provette tipo vortex	Piastre Petri monouso sterili (9 cm x 9 cm)
Bilancia tecnica	Cilindro in acciaio cavo (diametro da 3 mm)
Bilancia analitica	Puntali per micropipette
Bunsen	Microprovette da 1.8 ml con tappo ermetico a pressione
Agitatore magnetico	Ancoretta magnetica
Calibro o riga millimetrata per lettura	Pipette graduate
Camera umida	Provette comuni
Bagnomaria regolabile a diverse temperature	Cilindri graduati
Personal computer e software per elaborazione dati	Bottiglie

REAGENTI

Acqua distillata	microprovette a temperatura inferiore a -70°C .
Tampone sodio fosfato 1/15 M p/v, pH 6,3.	Siero standard per il controllo di qualità ottenuto distribuendo il siero di un bovino con valori di Lisozima nella normalità in aliquote da 100 μl in microprovette conservate a temperatura inferiore a -70°C .
Lisozima (Sigma) da conservare a -20°C . La soluzione di Lisozima Standard si ottiene diluendo 32 mg di Lisozima in 1 ml di tampone sodio-fosfato e deve essere conservata in	

TERRENI

- Agarose type II Medium EEO (Sigma) da conservare in frigorifero.

SISTEMI DI SAGGIO

- *Micrococcus Lysodeiکتicus* (Sigma) da conservare a -20°C . La sospensione batterica uso viene ottenuta diluendo 0.5 g di *Micrococcus lysodeiکتicus* in 20 ml di Tampone sodio fosfato. Tale sospensione viene conservata in microprovette, al volume di 150 μl , in congelatore a -20°C .

PROCEDIMENTO

Preparazione del campione - Tenere il sangue prelevato per 1-2 h a temperatura ambiente e per 2-3 h refrigerato. Staccare il coagulo dalle pareti della provetta con una pipetta sterile. Centrifugare la provetta per 10' a 800-1000 rpm. Prelevare il siero in sterilità. Il campione può essere saggiato fresco o scongelato dopo averlo aliquotato in microprovette sterili e conservato a temperatura inferiore a -70°C .

Preparazione delle piastre - Sciogliere 1 g di Agarose in 100 ml di tampone Tampone sodio fosfato. Portare ad ebollizione in bagnomaria per 15', fino ad ottenere una soluzione omogenea. Mantenere la temperatura del terreno a 60°C mediante bagnomaria e, mantenendolo in costante agitazione su un agitatore elettromagnetico preriscaldato, aggiungere 200 ml della sospensione d'uso del *Micrococcus Lysodeiکتicus*. Distribuire in ogni piastra Petri, 20 ml della sospensione ottenuta. Lasciare solidificare. Le piastre possono essere utilizzate subito o conservate tra $+2$ e $+8$ gradi, capovolte e in sacchetti chiusi, per un massimo di 60 giorni. Se si utilizzano piastre tolte dal frigorifero, portarle a temperatura ambiente prima dell'uso. Praticare in ogni piastra, mediante l'ago in acciaio collegato alla pompa a vuoto, sei fori in modo che siano allineati due a due, alla distanza di 1,5 cm dal bordo della piastra e che la distanza tra il centro di due pozzetti contigui sia di 2 cm. Contrassegnare il numero identificativo del campione sul retro della piastra, in corrispondenza di ogni coppia di pozzetti praticati. Preparare 3 piastre con cinque fori alle distanze sopra indicate e contrassegnare ogni foro con una diversa concentrazione della soluzione standard di Lisozima.

Preparazione del lisozima standard - Distribuire in provette di vetro comuni le seguenti quantità di tampone sodio fosfato:

provetta A : 10 ml	provetta D : 1 ml
provetta B : 3 ml	provetta E : 1 ml
provetta C : 1 ml	provetta F : 1 ml

Aggiungere alla provetta A 10 ml della soluzione standard di Lisozima per ottenere la soluzione standard di 32 $\mu\text{g/ml}$.

Aggiungere alla provetta B 1 ml della soluzione contenuta nella provetta A per ottenere la soluzione standard a 8 $\mu\text{g/ml}$.

Aggiungere alla provetta C 1 ml della soluzione contenuta nella provetta B per ottenere la soluzione standard a 4 $\mu\text{g/ml}$.

Aggiungere alla provetta D 1 ml della soluzione contenuta nella provetta C per ottenere la soluzione standard a 2 $\mu\text{g/ml}$.

Aggiungere alla provetta E 1 ml della soluzione contenuta nella provetta D per ottenere la soluzione standard a 1 $\mu\text{g/ml}$.

Aggiungere alla provetta F 1 ml della soluzione contenuta nella provetta E per ottenere la soluzione standard a 0.5 $\mu\text{g/ml}$.

Deposizione del campione - Deposare il campione di siero in due pozzetti al volume di 10 μl /pozzetto.

Deposizione del lisozima standard - Distribuire 10 μl pozzetto di ogni diluizione della soluzione standard di Lisozima.

Incubazione delle piastre - Incubare le piastre a 37°C, in camera umida, per 16 h.

Lettura - Misurare il diametro degli aloni utilizzando un calibro o un righello. Nella misura viene considerato anche il diametro del pozzetto.

CALCOLO DEL RISULTATO

Calcolare per ogni campione il valore medio dei due diametri di inibizione misurati.

Calcolare per ogni concentrazione della soluzione standard il valore medio dei tre diametri di inibizione.

Disegnare la curva dello standard mettendo in ascissa il valore del logaritmo in base 10 delle diverse concentrazioni della soluzione standard di lisozima e in ordinata i diametri degli aloni di inibizione in millimetri.

I risultati vengono ottenuti calcolando la retta di calibrazione dello standard di lisozima e introducendo i valori medi degli aloni di inibizione dei campioni in esame.

Il risultato viene espresso in $\mu\text{g/ml}$ di lisozima.

VALORI NORMALI NEL SIERO

Questi possono differire in funzione della razza e della categoria zootecnica. I valori normali sono compresi tra 1 e 3 $\mu\text{g/ml}$. Nelle bovine da latte di razza Frisone possono essere presenti concentrazioni inferiori, forse in relazione alla maggiore presenza di inibitori solubili dializzabili. In generale, le concentrazioni tissutali sono assai superiori a quelle sieriche.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il lisozima è un fattore importante della difesa antinfettiva non specifica. In condizioni normali, la concentrazione di lisozima nel siero viene principalmente mantenuta dal rilascio dei neutrofili in degenerazione. La determinazione del lisozima sierico fornisce informazioni sul numero e l'attività dei granulociti e sulla attività funzionale del sistema monocitario-macrofagico. In questo senso, valori abnormemente elevati sono correlati all'insorgenza di stati infiammatori. La carenza di lisozima è indice prognostico negativo, in quanto tale sostanza interviene con differenti meccanismi nella batteriostasi, batteriolisi, battericidia ed aggregazione batterica. La concentrazione di lisozima viene alterata da infezioni, immunizzazioni e stimoli aspecifici (adiuvanti). L'inoculazione sperimentale di lisozima comporta l'insorgenza di effetti immunoregolatori. Viene inoltre ammesso un ruolo importante del lisozima per la difesa locale delle mucose.

BIBLIOGRAFIA

- 1) OSSERMAN E.F.,LAWLOR D:P: (1966). J.Exp. Med., 124 : 921-952
- 2) MÜLLER G. ET AL. (1990), Arch. Exper. Vet. Med., 44, 793-801.

TITOLAZIONE SEMIQUANTITATIVA DEL COMPLEMENTO EMOLITICO NEL SIERO BOVINO

PREMESSA

Il metodo si applica al siero di sangue bovino prelevato con provetta vacutainer senza anticoagulante al fine di determinare in forma semi-quantitativa la concentrazione delle proteine del sistema del complemento. La prova fornisce indicazioni sullo stato di benessere in cui si trova il soggetto, con particolare riguardo alla competenza immunitaria nei confronti dei patogeni ambientali e delle patologie a sfondo flogistico subacuto-cronico. Il saggio può essere eseguito su siero fresco o congelato a temperatura inferiore a -70°C .

PRINCIPIO

Il saggio si basa sulla quantificazione dell'attività litica del siero nei confronti delle emazie di coniglio (via alternativa di attivazione del complemento).

STRUMENTAZIONE E MATERIALE

Frigorifero	Microshaker per piastre a 96 pozzetti
Congelatore a temperatura inferiore a -70°C	Puntali per micropipette
Micropipetta a volume variabile	Provette da 1.8 ml con tappo ermetico a pressione
Pipettatrice automatica	Provette in plastica sterili con tappo a vite e fondo a V da 14 ml e da 50 ml.
Centrifuga da banco con adattatori per piastre microtiter a 96 pozzetti	Siringhe da 10 ml sterili monouso.
Micropipette a 12 canali a volume variabile	Piastrine 96 pozzetti per micrometodo con fondo a U
Spettrofotometro per piastrine a 96 pozzetti con stampante completo di filtro per lettura a 550 nm. di lunghezza d'onda	Pipette graduate
	Provette da 10 ml

REAGENTI

Acqua distillata	Sangue di coniglio
Soluzione anticoagulante di Alsever	Emolisina di montone (siero immune di montone anti-globuli rossi di coniglio)
Tampone Veronal concentrato 5X (Sodio 5.5 Dietilbarbiturico). Preparare la soluzione USO diluendolo 1/5 con acqua distillata.	Siero standard bovino a valore di Complemento Emolitico noto

PROCEDURA

Preparazione del Sistema emolitico - Prelevare dal cuore di coniglio 5 ml di sangue, con una siringa da 10 ml, contenente 5ml di soluzione di Alsever. Questa preparazione di eritrociti avrà

una durata di circa 2 settimane, se conservata tra +2 e +8°C. Prelevare 2 - 3 ml della sospensione di globuli rossi. Aggiungere tampone Veronal USO fino a raggiungere il volume di 12 ml. Centrifugare per 10' a 1500 rpm. Togliere il sovrantante mediante una pipetta da 10 ml, facendo attenzione a non rimuovere i globuli rossi dal fondo della provetta. Ripetere l'operazione di lavaggio dei globuli rossi almeno 3 volte, o fino a quando il sovrantante non sarà limpido. Preparare una sospensione di globuli rossi al 6%.

test dell'emolisina - (il test va eseguito solo una volta, prima di utilizzare il sistema emolitico nelle prove). Preparare tre provette di sistema emolitico (s.e.) seguendo le seguenti modalità operative:

- a) provetta contenente 0,5 ml. di eritrociti al 6% + 0,5 ml. di tampone veronal uso.
- b) provetta contenente 0,5 ml. di eritrociti al 6% + 0,5 ml. di emolisina diluita 1 : 200 in tampone Veronal (1 : 400 finale).
- c) provetta contenente 0,5 ml. di eritrociti al 6% + 0,5 ml. di emolisina diluita 1 : 400 in tampone Veronal (1 : 800 finale).

Incubare le provette tappate per 20' a bagnomaria a +37°C

Allestire una titolazione del siero standard di bovino secondo quanto sotto descritto ed utilizzando i tre diversi tipi di s.e. preparati (a,b,c).

Calcolare le unità di C'H50 del siero standard con i tre diversi sistemi emolitici.

Se il siero bovino standard raggiunge il titolo consueto in presenza di emazie non sensibilizzate dalla emolisina, tale emolisina non verrà impiegata nel test. Altrimenti, se gli eritrociti risulteranno scarsamente sensibili alla lisi, si impiegherà l'emolisina alla diluizione che permette di rientrare nel titolo consueto dello siero standard bovino.

Esame dei campioni - Mettere 150 µl di acqua distillata in ogni pozzetto della colonna 1 della piastra a 96 pozzetti (100% di emolisi).

Mettere 150 µl di tampone veronal uso nella colonna 12 (0% di emolisi, bianco).

Porre 100 µl di tampone veronal uso nei pozzetti delle colonne 3,4,5,6 delle righe A,B,C,D.

Mettere 150 µl di tampone Veronal uso nei pozzetti della colonna 2 delle righe A,B,C,D.

Mettere nei pozzetti A2 e B2 50 µl. del siero in esame (diluizione finale nel pozzetto 1/4).

Mettere nei pozzetti C2e D2 50 µl del siero standard. Spipettare e trasferire 100 µl di soluzione dai pozzetti della colonna 2 a quelli della colonna 3. Ripetere tale operazione fino alla

colonna 6. Rimuovere dalla colonna 6 100 µl ed eliminarli. Aggiungere 50 µl di tampone

Veronal uso in tutti i pozzetti dalla colonna 6 alla colonna 2. Aggiungere a tutti i pozzetti

utilizzati 25 µl di sistema emolitico al 3%. Agitare blandamente la piastra e incubarla in

bagnomaria per 30' a +37°C. Centrifugare la piastra per 2' a 2000 rpm. Trasferire con pipetta

multicanale 100 µl del sovrastante di tutti i pozzetti, partendo dalla colonna 12 fino alla

colonna 1, in una piastra a 96 pozzetti vuota. Leggere la piastra con lo spettrofotometro a

550 nm sottraendo il valore del blank (un pozzetto qualsiasi della colonna 12).

CALCOLO DEL RISULTATO

Calcolare il valore di densità ottica medio dei pozzetti del campione e dei pozzetti dello standard, eseguiti in doppio.

Calcolare il valore medio della densità ottica dei pozzetti della fila 1, non considerando i valori massimo e minimo. Il valore risultante rappresenta il 100% di emolisi.

Vengono utilizzati per il calcolo finale i valori medi dei pozzetti del campione e dello standard inferiori in densità ottica al 100% e superiori al 10% di emolisi.

Per il calcolo del titolo del campione e dello standard sono necessari valori di almeno due diverse diluizioni del siero che rientrino nell'intervallo sopra indicato.

Il contenuto in unità emolitiche 50% contenute nel campione viene calcolato utilizzando una elaborazione matematica inserita in un foglio elettronico. In pratica, l'emolisi può essere rappresentata in un diagramma, dove *in ascissa* sono rappresentati in forma logaritmica i logit * di emolisi e in ordinata i logaritmi del numero di microlitri impiegati. Da tale diagramma si ricava una retta $Y = a + bX$. Da tale retta si calcola il valore di ordinata Y corrispondente al 50% di emolisi, ovvero a $X=0$.

L'attività totale del complemento emolitico contenuta nel campione in esame, cioè il titolo espresso come unità emolitiche C'H50/150 μ l, sarà uguale a: 150 (volume di reazione espresso in microlitri) x 4 (diluizione iniziale del campione) / antilogaritmo del valore Y corrispondente al 50% di emolisi. Esempio: 150 (microlitri) x 4 (fattore di diluizione) / 15 (numero di microlitri di siero che danno il 50% di emolisi) = 40 C'H50/150 μ l.

Il valore in C'H50/150 μ l del siero bovino standard deve rientrare all'interno di un intervallo definito in precedenza.

* logit di emolisi = proporzione di emolisi / 1 - proporzione di emolisi; con il 50% di emolisi avremo logit 1, ovvero 0 con la conversione in logaritmo.

VALORI DI RIFERIMENTO

Vitelli = ≥ 20 C'H50/150 μ l
Animali adulti = ≥ 30 C'H50/150 μ l

INTERPRETAZIONE DEL RISULTATO

L'importanza del sistema del complemento nell'ambito dei meccanismi della difesa immunitaria è ampiamente descritta. I motivi principali che fanno assumere un interesse particolare alla titolazione del complemento nel contesto delle difese aspecifiche si devono soprattutto alla sua attivazione per via alternativa. Quest'ultima infatti può essere innescata da numerosi agenti infettivi in assenza di anticorpi, oppure sperimentalmente da polisaccaridi complessi o lipopolisaccaridi della parete batterica. E' evidente dunque che un test in grado di valutare la carenza di complemento è di notevole aiuto predittivo nella analisi di forme patologiche infettive o di stati infiammatori generici; ciò è stato ben evidenziato in campo umano, dove la carenza o le variazioni a livello plasmatico di alcune componenti del complemento sono in stretta relazione con la comparsa e la severità delle infezioni. Il test sopra descritto si basa sull'attivazione del sistema del complemento per via alternativa, più pertinente pertanto ai meccanismi innati di difesa antinfettiva. L'eventuale aggiunta della emolisina di coniglio serve solo a migliorare l'efficienza della via alternativa, in seguito ad aumentata deposizione di C'3b e a un maggior numero di siti attivi di C'5 convertasi. La evidenziazione di ridotti livelli di complemento emolitico è indice di consumo in vivo, riferibile principalmente a stati flogistici; tale alterazione compare spesso in associazione alle alterazioni della formula leucocitaria e dell'elettroferogramma. Bisogna tenere presente che esiste una naturale evoluzione dei livelli di complemento emolitico nel vitello in funzione dell'età. L'evidenziazione di ridotti livelli di complemento è frequente nelle bovine da latte e molto più rara negli animali da carne.

BIBLIOGRAFIA

- 1) *Veterinary clinical immunology laboratory*, *Monographs in Animal immunology*, Vol.2 (1993), edited by Ota Barta, Bar-Lab. Inc.
- 2) PONTI W. ET AL (1989), J. Vet. Med. B 36, 402 – 408.

DETERMINAZIONE DELLA BATTERICIDIA SIERICA CON TEST IN MICROMETODO

PREMESSA

Il metodo è applicabile ai sieri di bovini adulti al fine di determinare la capacità battericida del siero in esame. Tale attività dipende dalla presenza nel siero di modeste concentrazioni di anticorpi naturali e dei fattori del complemento. Con il termine di anticorpi naturali si intendono quelli diretti contro le più comuni componenti della flora batterica ambientale, specie della famiglia Enterobacteriaceae. L'attività battericida del siero costituisce un parametro importante di funzionalità del sistema immunitario non specifico.

PRINCIPIO

La determinazione della Battericidia si esegue mettendo in coltura in piastre da micrometodo a 96 pozzetti una quantità nota di *E. coli* in presenza del siero bovino in esame, di un idoneo terreno nutritivo (Brodo Semplice) e di supporto (Tampone Veronal). La variazione tra la torbidità dei pozzetti di coltura in presenza e in assenza del siero in esame, misurata attraverso la lettura della loro densità ottica, è proporzionale alla capacità battericida del siero.

STRUMENTAZIONE E MATERIALE

Cappa a flusso laminare sterile	Micropipette multicanali a volume variabile
Autoclave	PHmetro
Stufa a secco	Spettrofotometro (con possibilità di lettura a 590 nm di lunghezza d'onda)
Congelatore a temperatura inferiore a -70 °C	Spettrofotometro per piastre a 96 pozzetti con capacità di lettura a 690 nm)
Supercentrifuga refrigerata (in grado di centrifugare a 10.000 rpm a +4°C)	Piastrine a 96 pozzetti fondo a U sterili con coperchio.
Bagno termostato	Provette in plastica da 1.5ml modello ependorf sterili.
Termostato	Cuvette di plastica monouso 1 cm. per lato
Camera umida	Provette a chiusura ermetica in plastica da 20 a 50 ml. sterili
Agitatore magnetico	Puntali in plastica per micropipette, sterili.
Agitatore per provette tipo vortex	Vetreteria da laboratorio, sterile
Bilancia	
Bunsen	
Micropipette a volume variabile	

REAGENTI

Acqua distillata sterile	Tampone Veronal
Soluzione fisiologica sterile	

TERRENI

Terreno BHI (brain heart infusion) liquido sterile	Latte UHTsterile.
Terreno brodo semplice liquido sterile	

MICROORGANISMI

Escherichia coli ceppo "O 119" WEYBRIDGE liofilizzato, in fase S.

PREPARAZIONE DELLA SOSPENSIONE DI PARTENZA

Risospendere una fiala di *E.coli* liofilizzata in 20 ml di terreno BHI, operando sterilmente in cappa a flusso laminare. Tale sospensione viene incubata per 18-24h a 37°C in blanda agitazione magnetica. Al termine dell'incubazione portare la cultura batterica a 5°C (usando un bagno di ghiaccio) e quindi supercentrifugare per 30' a 10.000 rpm a 4°C.

Dopo la centrifugazione, riportare le provette sotto cappa; eliminare il "sovrastante" e risospendere il pellet batterico in 20 ml di latte UHT sterile.

Aliquotare sterilmente la sospensione batterica, facendo aliquote da 500 – 600 µl in provette tipo eppendorf sterili e conservare a temperatura inferiore ai -70°C.

PROCEDURA

Tutte le operazioni di seguito descritte devono essere effettuate operando sterilmente.

Espansione di *E. coli* - Scongela velocemente una aliquota di *E. coli*; prelevare 500 µl e risospenderli in 15 ml di brodo semplice; porre il tutto in un piccolo matraccio da 25-50 ml. Prelevare 1,5 ml di tale sospensione batterica e determinare la sua densità ottica a 590 nm tramite lettura allo spettrofotometro. Tenere la sospensione in bagno termostato a +37°C per 4 ore. Eseguire ancora un controllo della densità ottica della sospensione. Sono considerati valori accettabili del secondo controllo quelli pari ad almeno due-tre volte la densità ottica iniziale. Le letture allo spettrofotometro in entrambi i casi devono essere eseguite utilizzando come bianco il brodo semplice adoperato nel test. Al termine dell'incubazione, subito dopo il controllo della densità ottica, porre la sospensione batterica in un bagno di ghiaccio a +4°C.

Titolazione di *E. coli* - Predisporre una serie di sette provette numerate da -1 a -7. Distribuire in ciascuna di esse 4,5 ml di soluzione fisiologica sterile. Prelevare 0,5 ml di sospensione di *E. coli* e deporli nella provetta siglata -1 contenente soluzione fisiologica; passare dopo agitazione a mezzo vortex 0,5 ml dalla provetta -1 alla provetta -2 e così via di seguito fino alla -7. In una piastrina sterile a 96 pozzetti con fondo a U distribuire nelle prime tre file verticali 100 µl di Brodo Semplice e 100 µl di tampone Veronal uso a pozzetto. Nei pozzetti A1,A2,A3 , distribuire 10 µl di sospensione non diluita di *E. Coli*. Nei pozzetti B1,B2,B3 distribuire 10 µl della diluizione di *E. Coli* -1 e proseguire così con le stesse modalità fino agli ultimi pozzetti H1,H2,H3, dove verranno distribuiti 10 µl dell'ultima diluizione di *E. Coli* cioè la -7 .Nella stessa piastrina predisporre in posizione A12 un pozzetto di Blank contenente 100 µl di Brodo semplice e 110 µl di tampone Veronal uso.

Infine in posizione H10,H11,H12, predisporre un controllo di attività del sistema; ovvero un controllo interno di crescita che conterrà 100 µl di Brodo semplice, 100 µl di tampone Veronal uso e 10 µl di diluizione di *E. Coli* -2, ovvero la diluizione alla quale più frequentemente cade il titolo. Incubare in camera umida in termostato a +37°C per 18-20 h. Leggere quindi in lettore Elisa con filtro a 690 nm e determinare la diluizione alla quale il valore di densità ottica va in plateau. Tale diluizione sarà quella definita "Uso" cioè la diluizione che verrà usata in seguito per testare i sieri e per il controllo di crescita.

Esame dei sieri - Testare i sieri bovini procedendo come segue: utilizzare almeno tre pozzetti per ciascun siero in esame e depositare per ciascun pozzetto 100 µl di Brodo semplice, 50 µl di tampone Veronal uso, 50 µl di siero da testare e 10 µl della diluizione di *E. coli* uso. Incubare in camera umida in termostato a +37°C per 18-20 ore. Leggere quindi in lettore Elisa con filtro a 690 nm, con bianco allestito sul controllo di sterilità (100 µl di Brodo semplice, 110 µl di tampone Veronal uso). Il controllo di crescita in triplicato comprende: 100 µl di Brodo semplice, 100 µl di tampone Veronal uso e 10 µl della diluizione di *E. coli* uso.

CALCOLO DEL RISULTATO

Calcolare le medie dei valori di densità ottica dei tre pozzetti di ciascun preparato dopo aver sottratto il valore del pozzetto contenente il bianco.

Il risultato del test espresso come valore percentuale di capacità battericida del siero in esame (%) viene così calcolato:

[(Media del controllo di crescita - media del campione in esame): (media del controllo di crescita)] x 100.

L'attività battericida normale del siero deve essere superiore al 90%.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il metodo descritto può essere applicato a soggetti di età superiore a 6 mesi, privi sostanzialmente di anticorpi di origine colostrale, poiché questi ultimi sono in grado di interferire sull'esito della prova. Per tali soggetti giovani è possibile eseguire solo il test in piastra (vedi Dorn W. et al., 1980). Di converso, prima della colostratura è dimostrabile attività battericida del siero solo verso *E. coli* in fase R. L'attività battericida dipende crucialmente dalla presenza di fattori del complemento: il trattamento termico scomplementante del siero abroga l'attività battericida. Il calo della attività battericida al di sotto dei valori normali indica una situazione a rischio per l'insorgenza di patologie condizionate e in particolare di setticemie. Tale riduzione della attività battericida si verifica abbastanza di rado, indica una fase terminale della capacità di adattamento ambientale e costituisce pertanto un indice prognostico negativo. Valori intorno al 90% circa già indicano un certo grado di alterazione delle condizioni fisiologiche.

BIBLIOGRAFIA

- 1) AMADORI M. ET AL, (1997), J. Vet. Med. B 44, 321 – 327.
- 2) BARTA O. ET AL, (1972), Am J. Vet. Res. 33, 731-740.
- 3) BARTA O. ET AL (1972), Am. J. Vet. Res. 33, 741 – 750.
- 4) DORN W. ET AL, (1980), Arch. Exper. Vet. Med. 34, 635 – 650.
- 5) TAYLOR P.W. (1983), Microbiol. Rev. 47, 46-83.

DETERMINAZIONE DELLA CAPACITA' DI BLASTIZZAZIONE LINFOCITARIA

PREMESSA

Il test di blastizzazione linfocitaria viene usato sia in immunologia clinica che sperimentale per valutare la funzionalità dei linfociti. Il campione è rappresentato dal sangue intero prelevato con provetta vacutainer, contenente eparina o K₃EDTA, dalla vena giugulare del bovino.

Il test consente di misurare la capacità della risposta immunitaria cellulosa - mediata evidenziando eventuali stati di immunodeficienza di origine patologica o legata a fattori ambientali (stress da trasporto), o a specifici momenti produttivi dell'animale (es. gravidanza, periodo post-partum, vitelli nelle prime settimane di vita).

Esistono molte procedure per eseguire questo test che a sua volta può essere influenzato da molteplici fattori (metodo di raccolta, conservazione e separazione delle cellule, tipo di mitogeno, tempo di incubazione ecc.).

Le condizioni indicate nella procedura sotto descritta sono quelle basate sull'esperienza maturata durante il periodo di utilizzo della metodica stessa.

PRINCIPIO

Il test si basa sul principio che i linfociti presenti nel campione di sangue intero messi a contatto con un mitogeno ad azione aspecifica (Concanavallina-A) iniziano a moltiplicarsi. In presenza di una base nucleotidica marcata con il trizio (Timidina Triziata, 3H, Methyl, 1,2 3H, thimidine AMERSHAM) questa viene incorporata nel DNA duplicato. La presenza di radioattività nelle cellule può poi essere rivelata mediante un contatore di radioattività. La radioattività incorporata è proporzionale alla capacità proliferativa dei linfociti T.

STRUMENTAZIONE E MATERIALE

Cappa a flusso laminare	Micropipetta multicanale a volume variabile
Autoclave	Sistema di raccolta cellulare (Filtermate Cell Harvester) da micropiastre 8x12 pozzetti (96)
Stufa a secco	Apparecchio Matrix 9600 TM Direct Beta Counters
Incubatore a 37 ± 1°C con 5% di CO ₂	Piastrine a 96 pozzetti per colture cellulare, fondo U, complete di coperchio, sterili
Bagno termostato alla temperatura di 56°C ± 1	Provette sterili in plastica da 1.5 ml
Frigorifero a temperatura di 5 ± 3°C	Filtri monouso per siringa 0.2 mm
Congelatore a temperatura inferiore a -20°C	Siringhe sterili monouso
Agitatore magnetico 0-500 giri minuto	Ancorette magnetiche
Agitatore per provette tipo vortex	Puntali per micropipette
Bilancia Tecnica	
Bilancia analitica	
Micropipette monocanali a volume variabile	

Filtri per Matrix Test e filtri Matrix per pulizia apparecchi Cell-Harvester	Fogli piccoli di alluminio Vetreteria comune sterile da laboratorio
--	--

REAGENTI

Acqua distillata sterile	Soluzione di Concanavallina-A 3X. La soluzione va preparata al momento dell'esame e sterilmente. Diluire una aliquota di Concanavallina-A Stock 1/133 in terreno RPMI addizionato di siero fetale bovino al 10% (concentrazione finale della Concanavallina A nel pozzetto 2.5 µg/ml)
Tampone sodio fosfato pH 7,4 (PBS)	
L-Glutammina sterile	Soluzione di Timidina Triziata (³ H) stock uso. Diluire 1 ml della soluzione a 1mCi/ml di Timidina Triziata (o Methyl,1,2 ³ H, thimidine) in 49 ml di terreno RPMI completo di Siero fetale bovino al 10%(concentrazione finale 20µCi/ml). Distribuire sterilmente in aliquote da 1,5 ml. Conservare in frigorifero
Tween 20 conservato a temperatura ambiente	
Siero Fetale Bovino inattivato (SFB). Inattivare il siero fetale tenendolo per 30' in bagnomaria a 56 ± 1°C Conservarlo a in frigorifero fino al momento dell'uso. Conservare il siero non inattivato a temperatura inferiore a -20 C°	
Soluzione di Eparina Sodica 100X sterile. Sciogliere l' Eparina Sodica in polvere in terreno RPMI. Filtrare su filtro da 0.2 µm e conservare in frigorifero in aliquota unica. La soluzione 100X deve contenere 5000 U/ml.	Neomicina polvere
Soluzione di Concanavallina A sterile. Stock a 1 mg/ml. Filtrare su filtro da 0.2 µm e preparare delle aliquote da conservare congelate a -20°C	Bacitracina polvere
	Colimicina polvere

TERRENI

- Terreno RPMI 1640 del commercio già addizionato di Neomicina 0.0075%, Bacitracina 0.005%, Colimicina 0.002% , L-Glutammina 2 mM/litro , sterile. Tenere in frigorifero. Se la data di preparazione del terreno è antecedente alle sei settimane dall'uso aggiungere nuovamente la L-Glutammina.

PROCEDURA

Eeguire tutta la procedura in sterilità (cappa a flusso laminare) e con reagenti sterili.

Il laboratorio deve disporre di locali idonei e regolarmente abilitati all'uso di materiale radioattivo.

Preparazione del campione - Preparare in una eppendorf sterile 5µl di Eparina 100X. Mettere 0.5 ml di campione di sangue intero prelevato in K₃EDTA nella eppendorf e agitare per tre volte per inversione. Qualora il campione fosse stato prelevato in eparina non è necessario alcun trattamento.

Preparare per ogni singolo campione 600 µl di terreno RPMI al 10 % di siero fetale bovino. Distribuire nella piastra a 96 pozzetti in 2 pozzetti(esempio A1,A2), 150 µl/pozzetto di RPMI completo di SFB. Distribuire in altri 2 pozzetti (esempioB1,B2) 100 µl/pozzetto di RPMI completo di FCS e 50µl/pozzetto di Concanavallina-A 3X.

Deposizione del campione - Distribuire 5 µl del campione opportunamente preparato in tutti 4 i pozzetti. Bagnare pure il puntale contenente il sangue nei pozzetti di terreno avendo però cura di riempire sempre per primi i pozzetti contenenti solo terreno e senza Concanavallina-A. Agitare manualmente la piastra in modo da permettere a tutto il campione di distribuirsi uniformemente all'interno del pozzetto. Chiudere la piastra con il coperchio ed identificarla. Incubare la piastra a +37°C con 5% di CO₂ e atmosfera umidificata per 48 h.

Marcatura con isotopo radioattivo ³H - Preparare sotto cappa a flusso laminare un vassoio in alluminio e utilizzarlo come piano di lavoro per le prossime manualità (ovvero in tutte le operazioni in cui si utilizzeranno materiali venuti a contatto con materiale radioattivo). Posizionare la piastrina nel vassoio ed aggiungere ad ogni pozzetto 10 µl. di Timidina Triziata ³H alla diluizione d'uso. Incubare la piastra a +37°C e 5% di CO₂ .

Raccolta del campione con "harvester" - Dopo 18 h dall'aggiunta dell'isotopo radiattivo si procede alla fase di raccolta delle cellule togliendo la piastra dall'incubatore e aggiungendo a ciascun pozzetto 25µl di soluzione PBS al 5% di Tween 20 e raccogliendo il materiale radioattivo su filtro di nitrocellulosa mediante la strumentazione dedicata e seguendo le istruzioni specifiche.

Conta della radioattività mediante MATRIX - Il filtro viene posizionato nel suo alloggiamento e inserito nell'apparecchiatura (MATRIX), il cui processore provvederà alla lettura e al calcolo delle cpm (Conte per minuto).

CALCOLO DEL RISULTATO

Calcolare il valore medio dei valori di cpm rivelati nei due pozzetti non contenenti la Concanavallina A (cpm blank) e verificare che tali valori non siano elevati . Calcolare la media e la deviazione standard dei valori di cpm rivelati nei pozzetti stimolati con la Concanavallina A(cpm Con-A).

Il risultato può essere espresso come:

cpm: valore medio delle conte per minuto dei pozzetti stimolati.

VALORI NORMALI

> 750 cpm nei campioni prelevati in K₃EDTA.

> 2500 cpm nei campioni prelevati in eparina.

INTERPRETAZIONE DEL RISULTATO

La evidenziazione di valori di blastizzazione inferiori ai livelli normali sopra riportati indica una ridotta attività funzionale dei linfociti T, correlabile ad una ridotta immunocompetenza generale dell'animale nei confronti dei patogeni ambientali. Ciò può essere conseguenza di stress cronici o acuti, come un trasporto su strada prolungato. In questo caso, il picco di depressione si manifesta a distanza di 4-5 giorni dal trasporto. La persistenza di ridotta blastizzazione linfocitaria è correlabile all'emergere di diverse patologie condizionate. E' opportuno che i prelievi di sangue vengano effettuati nelle stesse ore della giornata per

tenere conto dei ritmi pulsatili del cortisolo e di altri possibili fattori inibenti. Bisogna inoltre tener presente che l'incorporazione totale di Timidina Triziata dipende dal numero totale di linfociti reattivi, non dal grado di reattività dei singoli linfociti. Pertanto, poiché il test non è standardizzato sul numero di linfociti effettivamente presenti nei campioni di sangue, i valori sopra indicati costituiscono una indicazione di massima di livelli soglia.

BIBLIOGRAFIA

- 1) WHITBREAD T.J., ROWAN T.G. (1986) *Simple technique for examining lymphocyte blastogenesis in whole blood cultures for neonatal calves*. Res. Vet. Sci., 40, 161 - 165

DOSAGGIO DELL'APTOGLOBINA NEL SANGUE BOVINO

PREMESSA

L'aptoglobina (Hp) è una glicoproteina di fase acuta sintetizzata dal fegato in risposta a mediatori solubili prodotti dai leucociti e dai macrofagi ed è presente nel sangue di alcune specie animali. In condizioni normali essa è assente o presente a bassi livelli. L'aptoglobina incrementa significativamente in risposta a problemi infettivi, infiammatori, traumi, disordini immunitari, neoplasie. L'aptoglobina diminuisce in caso di emolisi intravascolare. Il metodo si applica a campioni di siero o di plasma.

Le diverse specie animali differiscono tra loro per l'importanza relativa delle diverse proteine di fase acuta; nel bovino possono essere importanti (oltre all'aptoglobina) anche la sieromiloide A e l'alfa1 glicoproteina acida. Parallelamente all'incremento di queste proteine, si assiste al decremento della alfa2 macroglobulina, del Ferro e dello Zinco plasmatici.

Oltre alla procedura di seguito esposta, esiste la possibilità di dosare l'aptoglobina bovina tramite i kit commercialmente disponibili.

PRINCIPIO

L'aptoglobina è in grado di formare complessi stabili con l'emoglobina (Hb). Il metodo di dosaggio si basa sulla differenza di attività perossidasi in ambiente basico della emoglobina libera e di quella legata all'aptoglobina. In particolare l'emoglobina libera in ambiente basico perde la attività perossidasi mentre il legame con l'aptoglobina lo preserva. Aggiungendo al campione in esame una quantità nota di emoglobina e lavorando a pH basici l'attività perossidasi residua è direttamente proporzionale alla aptoglobina presente.

STRUMENTAZIONE E MATERIALE

Termostato a temperatura di +37°C	Congelatore a temperatura inferiore a -70°C
Frigorifero a temperatura di +5 ± 3°C	Puntali per micropipette
Congelatore a temperatura di -20 ± 5°C	Ancoretta magnetica
Bilancia tecnica	Microprovette tipo Eppendorf
Agitatore magnetico	Carta da filtro
Micropipette a volume variabile	Pipette graduate
Pipettatrice automatica	Provette comuni
PH-metro	Cilindri graduati
Cappa chimica	Bottiglie scure

REAGENTI

Acqua distillata	Soluzione fisiologica
O-Dianisidina (attenzione, reagente pericoloso da preparare sotto cappa chimica). Sciogliere in 1000 ml di acqua bidistillata 15.6 gr di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.6 gr di O-Dianisidina e 0.5 gr di 2Na-EDTA. Dopo averla lasciata in agitazione per una notte al buio, filtrare la soluzione. Portare il pH a 4.1 ± 0.05 con 2 o 4 gocce di H_3PO_4 concentrato. Conservare la soluzione in bottiglia scura a temperatura ambiente. Quando la soluzione viene riutilizzata dopo un mese dalla sua preparazione filtrarla prima dell'uso.	Colonna di G25 Sephadex
Standard di aptoglobina. Concentrare 3 volte un siero con valori di aptoglobina superiori a 150 HbBC mg/dl	Hb standard: lavare 5 volte con Soluzione Fisiologica i globuli rossi (a 1500 giri per 10 minuti) di un campione di sangue prelevato in provetta con EDTA. A quattro volumi di eritrociti aggiungere 2 volumi di H_2O distillata e uno di toluene. Agitare al vortex e centrifugare a 3500 rpm per 15 minuti. Eliminare il surnatante. Aggiungere 3 gocce di Ferrocianuro di potassio al 10% per 5 ml di sedimento. Attendere 10 minuti. Caricare la colonna G 25 (dopo averla lavata con la soluzione 0.15 M di NaCl) con tutto l'emolisato. Raccogliere l'Hb. Determinare la concentrazione di Hb (mediante kit del commercio). Aggiungere la soluzione di NaCl 0.15 M fino ad ottenere una concentrazione di Hb di 3 g/dl. Fare aliquote di circa 70ml e stoccare nel congelatore a -20°C . L'Hb può essere utilizzata per sei mesi.
H_2O_2 200 mM	
Ferrocianuro di potassio al 10%. Da conservare al buio	
Soluzione 0.15 M di NaCl	

PROCEDURA

Tutta la procedura deve essere eseguita sotto cappa chimica e si applica soltanto a campioni non emolitici.

Preparare due gruppi di provette composti ciascuno da:

- una provetta per il blank
- una provetta per lo standard di aptoglobina
- una provetta per ciascun campione.

Mettere 5 ml di O-dianisidina uso in uno dei due gruppi di provette.

Preparare l'emoglobina uso diluendo 1 a 100 con acqua distillata l'Hb congelata.

Distribuire 100 μl dell'Hb uso in tutte le provette della serie senza o-dianisidina e aggiungere:

nella provetta per il blank	20 μl di H_2O distillata
nella provetta per lo standard	20 μl di aptoglobina standard
nella provetta per il campione	20 μl di campione

Agitare.

Da ciascuna di queste provette trasferire 20 μl nelle provette corrispondenti che contengono 5 ml di o-dianisidina. Agitare e tappare.

Incubare le provette in bagnomaria per 45 minuti a 37°C .

Terminato il periodo di incubazione aggiungere in ciascuna provetta 50 μl di H_2O_2 200 mM.

Lasciare le provette a temperatura ambiente e al buio per un'ora.

Trasferire il contenuto di ciascuna provetta in cuvetta e leggerne il valore di assorbanza in Densità ottiche (OD) mediante spettrofotometro a 440 nm di lunghezza d'onda.

CALCOLO DEL RISULTATO

La concentrazione di aptoglobina espressa come mg di emoglobina legata dall'aptoglobina per 100 ml di siero (HbBC mg/dL) (Hemoglobin Binding Capacity) si ottiene applicando la seguente formula:

$$\text{HbBC (mg/dL)} = 150 \times \frac{(\text{OD campione} - \text{OD Blank})}{(\text{OD standard} - \text{OD Blank})}$$

VALORI DI RIFERIMENTO

< 10 HbBC mg/dL vitelli
< 10 HbBC mg/dL adulti

INTERPRETAZIONE DI RISULTATI

La evidenziazione di una risposta di fase acuta del fegato è un indice prognostico negativo; essa infatti implica che l'animale è prossimo al limite estremo della capacità di adattamento omeostatico alle condizioni ambientali. Tale risposta viene spesso osservata infatti in stadi pre-clinici o in presenza di affezioni clinicamente conclamate. Nel bovino, la concentrazione di aptoglobina può aumentare in tal caso fino a 300 volte entro 48 ore dall'infezione. La dimostrazione di aptoglobina si accompagna normalmente a quella di inversione della formula leucocitaria. Alti livelli di aptoglobina possono indicare un fenomeno acuto, medi livelli un fenomeno sub-acuto o cronico.

BIBLIOGRAFIA

1) MAKIMURA S., SUZUKI N., (1982) *Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases*. Jpn. J. Vet. Sci.,44 : 15-21.

ARCHETTI I.L., RAVAROTTO L.

ELETTROFORESI DELLE SIEROPROTEINE BOVINE

PREMESSA

Lo scopo della elettroforesi è quello di uno studio analitico delle proteine sieriche, realizzabile sfruttando la proprietà che le stesse hanno di migrare e separarsi se sottoposte a campi elettrici. L'elettroforesi nella sua applicazione su supporto solido, è la tecnica di primo approccio per lo studio delle alterazioni quali-quantitative delle principali proteine sieriche. Le alterazioni quantitative della composizione proteica del siero consistono nell'aumento o nella diminuzione di una o più frazioni proteiche, più di rado nella comparsa di proteine abnormi. Il più delle volte tali modificazioni sono senza conseguenze sul dato della protidemia totale, perchè l'aumento di determinate proteine è compensato da una contemporanea diminuzione di altre. Oltre alle applicazioni nel settore del benessere animale, la possibilità di dividere le varie classi proteiche è utile al fine dell'interpretazione clinica di determinate patologie conclamate.

PRINCIPIO

Con il metodo proposto le frazioni proteiche del siero, una volta separate elettroforeticamente e fissate in condizioni adatte, vengono sottoposte a colorazione ed analisi densitometrica.

ESECUZIONE DELL'ANALISI

Campione
siero

Principio del metodo
gel di agarosio da colorare con Amidoschwarz

Sistema analitico
analizzatore biochimico per elettroforesi Sebia Hydrasis LC, kit *Hydrasis Hydragel Protein(e) 15/30*, distribuito da Ciampolini

CALCOLO DEI RISULTATI

L'analisi densitometrica permette una accurata quantificazione relativa delle singole zone del tracciato elettroforetico. I valori relativi alle α -Globuline; γ -Globuline; β -Globuline vengono espressi dal densitometro oltre che graficamente anche in g/dL e valore %. E' inoltre espresso il valore del rapporto tra la quantità di Albumine e Globuline.

**Valori normali delle diverse frazioni proteiche nel siero di sangue bovino
in valori assoluti e relativi utilizzati dal laboratorio IZVE**

Bovino			
Proteine totali	64 – 85 g/l		
Albumine	31 – 37 g/l	41.0	- 49.0 %
Globuline			
- α 1-	2 - 3 g/l	3.3	- 3.8 %
- α 2-	5 - 7 g/l	7.2	- 8.3 %
- β 1-	2 – 3 g/l	3.2	- 3.7 %
- β 2-	6 – 10 g/l	10.2	- 11.4 %
- γ -	18 – 25 g/l	25.3	- 32.0 %

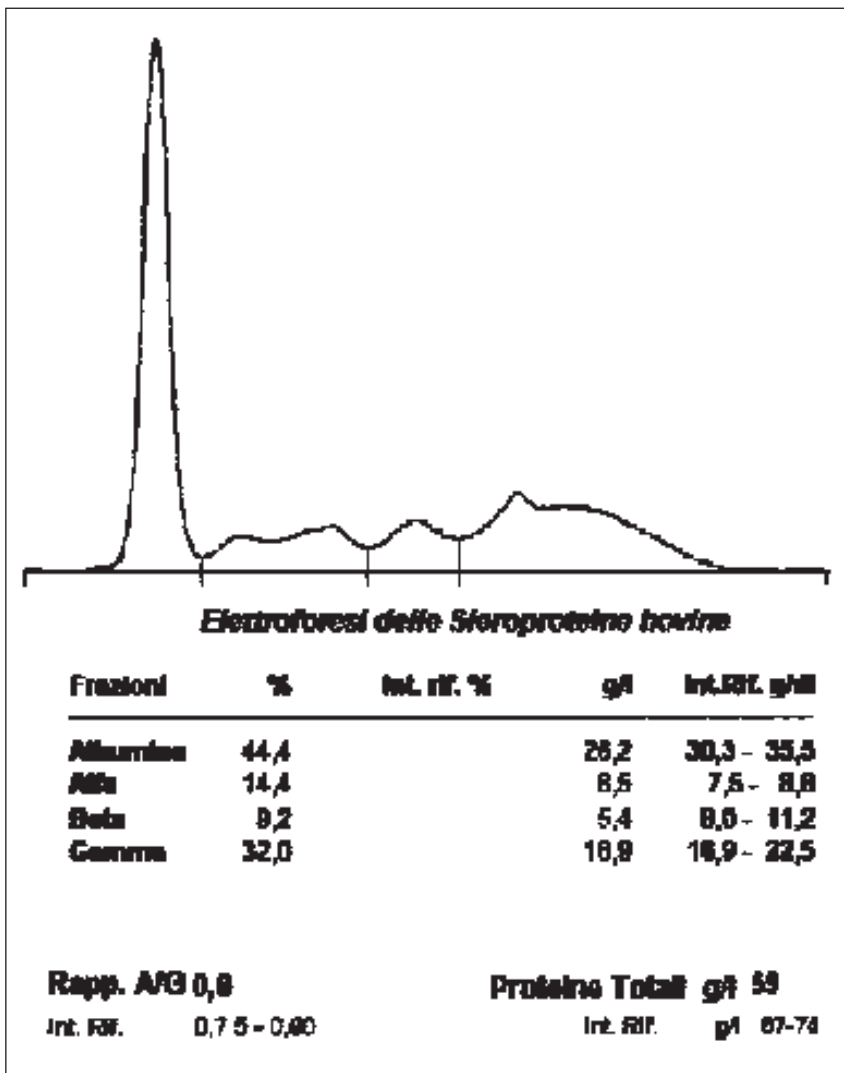
INTERPRETAZIONE DEL RISULTATO

Il metodo proposto comporta l'utilizzo di gel di agarosio pre-formati; tale procedura consente una buona separazione tra le proteine, specie nella zona delle alfa globuline. L'operatore è quindi in grado di identificare anomalie fini del tracciato, non rivelabili in passato con altre metodiche. Attraverso l'elettroforesi possiamo in particolare distinguere sottopopolazioni proteiche diverse. La modificazione della loro concentrazione sierica assume particolari significati in relazione alla problematica del benessere animale. Stati flogistici si accompagnano spesso ad alterazioni e distorsioni del tracciato elettroforetico, specie a carico della frazione delle α -globuline; tale fenomeno è riconducibile alla necessità di incrementare la produzione di siero-proteine ad azione antiinfiammatoria come α 1-antitripsina e α 2-macroglobulina, quale adeguamento omeostatico alle condizioni ambientali. Inoltre, una elevata gamma-globulinemia può essere riconducibile ad una elevata pressione infettante ambientale.

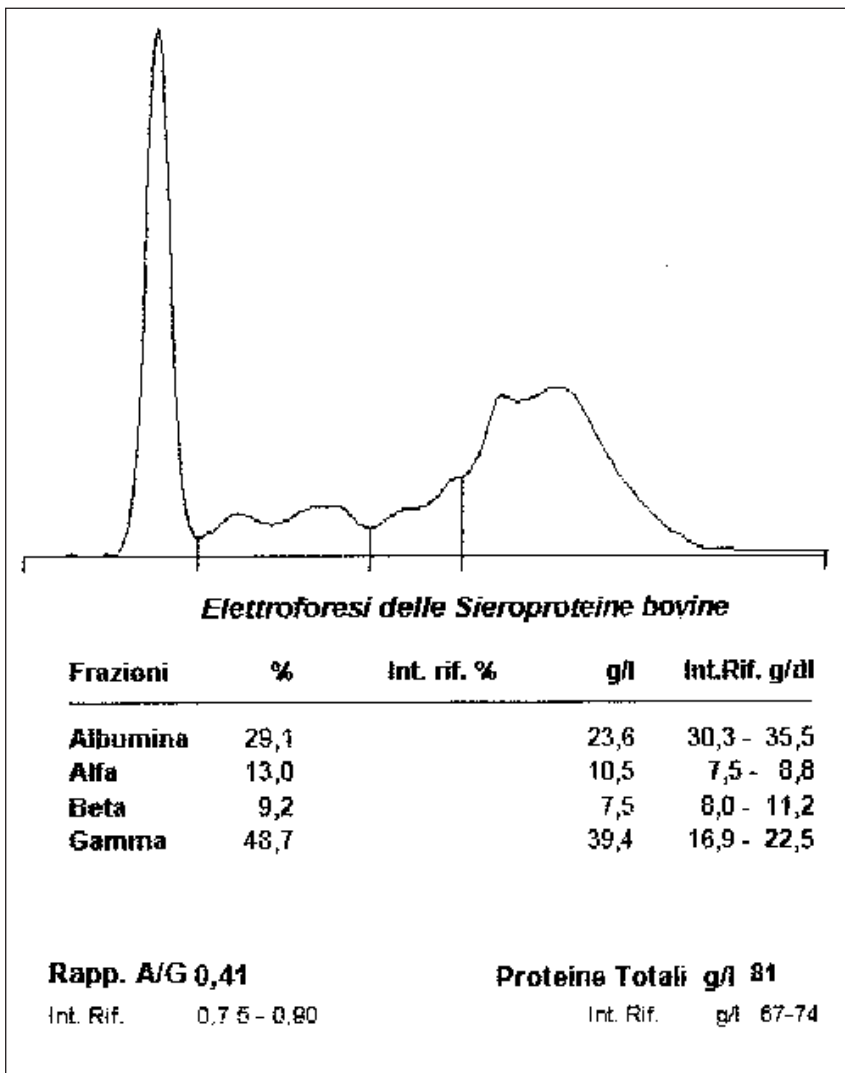
L'elettroferogramma fornisce indicazioni anche per diversi tipi di patologie. L'aumento della componente α -2 si ha a seguito di infiammazione acuta, malattie allergiche, nefrosi, polmonite, nell'insufficienza surrenalica e nella necrosi tessutale. L'incremento della frazione α -1 è invece secondario a necrosi tessutale, carcinomi, sindrome emorragiche, miocarditi e forme infiammatorie.

BIBLIOGRAFIA

- 1) *Monographs in Animal Immunology*, "Veterinary Clinical Immunology Laboratory", Edited by O. Barta, 1993, BAR-LAB, Blacksburg, USA.



Elettroforesi normale



Elettroforesi alterata

ARCHETTI I.L., RAVAROTTO L.*

ESAME EMOCROMOCITOMETRICO
E FORMULA LEUCOCITARIA MEDIANTE
STRUMENTO CELL-DYN 3500®

Reparto Benessere Animale Immunoprofilassi, IZSLER, Brescia

* Laboratorio di Analisi Chimico-Cliniche, IZSVE, Padova

PREMESSA

La descrizione dello strumento sopra riportato deriva dalla precisa attività svolta nei due laboratori.

Il metodo di prova si applica a campioni di sangue intero fresco raccolto e conservato in anticoagulante K₃EDTA.

I parametri ematologici determinati nella prova sono descritti nella tabella seguente e possono essere utilizzati come elementi di supporto per la diagnosi di stati clinici e sub-clinici.

DEFINIZIONI

WBC	<i>conteggio dei leucociti</i>
NEU	<i>conteggio assoluto dei neutrofil</i>
%N	<i>percentuale dei neutrofil</i>
LYM	<i>conteggio assoluto dei linfociti</i>
% LYM	<i>percentuale dei linfociti</i>
MONO	<i>conteggio assoluto dei monociti</i>
% M	<i>percentuale dei monociti</i>
EOS	<i>conteggio assoluto degli eosinofili</i>
% EOS	<i>percentuale degli eosinofili</i>
BASO	<i>conteggio assoluto dei basofili</i>
% BASO	<i>percentuale dei basofili</i>
RBC	<i>conteggio degli eritrociti</i>
HGB	<i>concentrazione di emoglobina</i>
HCT	<i>ematocrito</i>
MCV	<i>volume globulare medio</i>
MCH	<i>emoglobina globulare media</i>
MCHC	<i>concentrazione globulare media di emoglobina</i>
RDW	<i>ampiezza della distribuzione eritrocitaria</i>
PLT	<i>conteggio delle piastrine</i>
MPV	<i>volume piastrinico medio</i>
PDW	<i>ampiezza della distribuzione piastrinica</i>
PCT	<i>piastrinocrito</i>

PRINCIPIO

Lo strumento CELL-DYN, 3500® è in grado di misurare, contare e calcolare i parametri di ematologia ed è dotato di un software per uso veterinario.

Lo strumento aspira $130 \mu\text{l} \pm 5\%$ di campione e tramite la valvola di ripartizione lo suddivide in tre aliquote che vengono poi opportunamente diluite per la lettura.

La determinazione dei parametri ematologici si basa su quattro metodi di misurazioni indipendenti:

- Citometria ottica a flusso per il conteggio dei leucociti (WOC) e per i dati della formula leucocitaria. Tale metodologia è nota come tecnica MAPSS (Multi-Angle Polarized Scatter Separation), in particolare le cellule vengono fatte passare all'interno di un flusso e colpite con un raggio LASER. Dei sensori posti a diversa angolazione attorno alla cellula ne valutano poi la capacità di deviare il raggio (capacità diversa a seconda delle loro caratteristiche morfologiche). Gli angoli di dispersione misurati sono quattro: a 0° viene valutata la dimensione della cellula; a 10° si caratterizza la complessità della cellula; a 90° si misura la lobularità della cellula mentre a 90° depolarizzato si determina la granularità. L'elaborazione di questi dati porta alla classificazione di ogni cellula nelle cinque popolazioni leucocitarie.
- Canale di impedenza elettrica per il conteggio dei leucociti totali (WIC). Le cellule leucocitarie preventivamente diluite con il reagente di lisi WIC/HGB, vengono misurate al loro passaggio attraverso un orifizio di dimensioni note ($100 \mu\text{m}$ di diametro x $77 \mu\text{m}$ di lunghezza) posto tra due elettrodi. Tale passaggio produce una variazione transitoria della resistenza tra gli elettrodi traducibile in un impulso elettrico misurabile. Il numero di impulsi generati indica il numero di particelle che hanno attraversato l'orifizio. Il dato ottenuto conferma WOC.
- Canale di impedenza elettrica per il conteggio degli eritrociti e piastrine. Questo metodo si basa sulla misurazione delle variazioni di corrente elettrica che vengono prodotte quando una particella sospesa in un liquido conduttivo passa attraverso un orifizio di dimensioni note ($60 \mu\text{m}$ di diametro x $72 \mu\text{m}$ di lunghezza) posto tra due elettrodi. Tale variazione viene poi tradotta in impulso elettrico misurabile. Il numero di impulsi generati indica il numero di particelle che hanno attraversato l'orifizio, mentre l'ampiezza di ciascun impulso è proporzionale al volume della cellula che lo ha prodotto.
- Spettrofotometria per il dosaggio dell'emoglobina. Questo procedimento si basa sulla determinazione colorimetrica dell'emoglobina liberata per lisi degli eritrociti e resa stabile dal reagente di lisi WIC/HGB. La densità ottica del campione letta dallo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 540 nm è direttamente proporzionale alla concentrazione di emoglobina.

I parametri non direttamente misurati dallo strumento, sono calcolati ed elaborati in base a quanto descritto sotto.

STRUMENTAZIONE E MATERIALE

- Analizzatore multiparametrico automatizzato CELL-DYN, 3500® della Abbott Divisione Diagnostici completo di stazione elaborazione dati che utilizza il software dedicato versione 6.1¹, schermo e stampante
- Microprovette.

REAGENTI

Reagente di lisi WIC/HGB senza CN	Detergente enzimatico
Detergente	Diluente
Reagente sheath	Controllo di qualità

PROCEDURA

Tutte le prestazioni indicate dal Manuale di Impiego dello strumento sono state ottenute da campioni di sangue intero fresco prelevati in anticoagulante K₃EDTA secondo la prassi usata solitamente per qualsiasi analisi di laboratorio nel rispetto delle proporzioni tra il fluido biologico e l'anticoagulante, tale da evitare la formazione di coaguli o altra alterazione del sangue che possa modificare il risultato dell'analisi.

- E' opportuno che il tempo intercorrente tra prelievo ed analisi sia inferiore a 6 ore, affinché non intervengano modifiche strutturali di membrana che compromettono l'affidabilità dell'analisi.
- Conservare le provette di sangue sempre chiuse. Prima dell'analisi riportare il campione a temperatura ambiente e premiscelare lo stesso ruotandolo e capovolgendolo delicatamente fino a completa risospensione delle cellule. Effettuare l'analisi del campione nel più breve tempo possibile.
- Analisi. Permettere l'aspirazione del campione da parte dello strumento e seguire le indicazioni della casa fornitrice anche per quanto concerne il controllo di qualità.

CALCOLO DEL RISULTATO

Il risultato delle analisi è fornito in automatico dallo strumento in base alle misurazioni e/o calcoli dei vari parametri come specificato nelle tabelle:

Parametri ottenuti per misurazione diretta:

WIC, WOC, %NEU, %LYM, %MONO, %EOS, %BASO, RBC, MCV, HGB, PLT.

Parametri ottenuti per calcolo

Formula di calcolo

NEU	WBC X %NEU
LYM	WBC X %LYM
MONO	WBC X %MONO
EOS	WBC X %EOS
BASO	WBC X %BASO
HCT	(RBCxMCV) /10
MCH	(HGB/RBC) x10
MCHC	(HGB/HCT) x100

Parametri ottenuti per calcolo**Formula di calcolo**

RDW	C.V. derivato dell'istogramma eritrocitario utilizzando l'ampiezza della distribuzione eritrocitaria al 50% dell'altezza del picco
MPV	Derivato dall'istogramma
PCT	$(PLT \times MPV) / 10.000$

Le modalità di espressione dei dati sono quelle riportate di seguito:

Parametro	Unità di misura	Parametro	Unità di misura
RBC	M/ μ l	% NEU	%
HGB	g/dl	LYM	K/ μ l
HCT	%	% LYM	%
MCV	fl	MONO	K/ μ l
MCH	pg	% MONO	%
MCHC	g/dl	EOS	K/ μ l
RDW	%	% EOS	%
PLT	K/ μ l	BASO	K/ μ l
WBC	K/ μ l	% BASO	%
NEU	K/ μ l		

INTERPRETAZIONE DEL RISULTATO

Nell'ambito della problematica del benessere animale, le alterazioni più importanti riguardano la conta e formula leucocitaria, l'ematocrito e l'emoglobina. La conta e la formula leucocitaria alterati indicano in particolare la presenza di una turbativa ambientale che induce un tentativo di adeguamento omeostatico di entità diversa. In particolare, è spesso possibile osservare alterazioni del normale rapporto mono/polinucleati in assenza di fenomeni di leucocitosi. Questi sono più spesso indice di veri e propri fenomeni settici. Al di là di questa condizione, si può talora osservare soprattutto nelle bovine da latte una cospicua monocitosi, possibile indice di stati infiammatori cronici. Tale condizione è molto più rara negli animali da carne.

L'ematocrito è un indice di disidratazione e può essere correlato a trasporto prolungato degli animali in condizioni disagiate.

Il mantenimento del valore minimo di emoglobina previsto dalla legge (7,3 g/dL) è di importanza fondamentale per l'allevamento del vitello a carne bianca; tale adempimento rappresenta una garanzia che gli animali non siano costretti a subire diete eccessivamente carenti di ferro in grado di compromettere le loro condizioni di benessere.

Eritrociti (RBC)

Funzione biologica: Gli eritrociti sono elementi corpuscolati del sangue privi di nucleo e contenenti emoglobina. Fondamentalmente sono addetti ai processi di trasporto dell'ossigeno e dell'anidride carbonica.

Interpretazione: Diverse sono le cause che determinano variazione del numero di eritrociti. La loro diminuzione si può avere a seguito di anemia, emorragie, eritrolisi, parassitosi, malnutrizione, carenze vitaminiche, malattie sistemiche, insufficienza renale ed avvelenamenti da dicumarinici.

Il loro incremento (policitemie) può derivare da disidratazione, insufficienza respiratoria cronica.

Valori normali nel sangue bovino: (K/ μ L) da Feldman B.F. et al., 2000 Bovini 5.00 - 10.00

Emoglobina (HGB)

Funzione biologica: l'emoglobina è una cromoproteina porfirinica contenente ferro ed è veicolata dalle emazie. Agisce come intermediaria degli scambi di ossigeno tra le cellule e l'ambiente.

Interpretazione: la concentrazione di emoglobina può aumentare a seguito di poliglobulie o eritrocitosi; la diminuzione può invece essere correlata a forme di anemia ipocromica.

Valori normali nel sangue bovino (g/dl) da Feldman B.F. et al., 2000 Bovini 8.00 - 15.00

Ematocrito (HCT o PCV)

Funzione biologica: l'ematocrito rappresenta il volume percentuale occupato dagli eritrociti nel sangue venoso.

Interpretazione: il valore dell'ematocrito può aumentare come conseguenza ad ustioni, poliglobulie, plasmorragie, diarrea, vomito, denutrizione, nefrite cronica interstiziale e malnutrizione. La sua diminuzione invece, è secondaria a scompensi idrici, congestione circolatoria, cardiopatie, congestizie e intossicazione da cortisone.

Valori normali nel sangue bovino (%) da Feldman B.F. et al., 2000 Bovini 24.0 - 46.0

MCV, MCH e MCHC

Funzione biologica: l'MCV corrisponde al volume medio eritrocitario ed è uno dei parametri più significativi per una diagnosi differenziale nelle anemie.

L'MCH identifica la quantità media di emoglobina contenuta negli eritrociti.

L'MCHC indica la concentrazione emoglobinica cellulare media.

Interpretazione: l'MCV e l'MCH aumentano nel caso delle anemie macrocitarie ipercromiche, mentre decrescono nelle anemie microcitarie ipocromiche.

L'MCHC decresce nelle anemie ferroprive, nell'emoglobinopatia, risulta invece normale nelle anemie non sideropeniche.

Valori normali nel sangue bovino da Feldman B.F. et al., 2000

MCV (fl) Bovini	40	-	60
MCH (pg) Bovini	11.0	-	17.0
MCHC (g/dl) Bovini	30	-	36

Leucociti (WBC)

Funzione biologica: i leucociti sono cellule nucleate del sangue capaci di partecipare all'eliminazione di diversi elementi estranei, con lo scopo di difendere adeguatamente l'organismo. Si suddividono in granulociti (neutrofili, basofili ed eosinofili) ed agranulociti (linfociti e monociti) in base a particolari caratteristiche citoplasmatiche (presenza di granuli).

Interpretazione: La variazione del numero dei leucociti totali assume particolare significato clinico. L'aumento del loro numero può essere secondario a stati infettivi acuti, stress, gravidanza, lavoro muscolare, infezioni localizzate, intossicazioni esogene ed endogene, post-emorragie e forme leucemiche. La diminuzione del loro numero diventa invece secondaria a malattie virali, anemie aplastiche, stati anafilattici, tossicosi croniche e stati di malnutrizione. Un significato maggiore assume la variazione del loro numero in riferimento alle singole popolazioni cellulari, come descritto da Feldman B.F. et al., 2000.

<i>POPOLAZIONE LEUCOCITARIA</i>	<i>CAUSE DI AUMENTO</i>	<i>CAUSE DI DIMINUZIONE</i>
<i>Neutrofili (Neu)</i>	Corticosteroidi, emolisi emorragie, infiammazioni acute, necrosi, miositi ed infarto	Ipoplasia o necrosi del midollo osseo, malattie linfoproliferative, infezioni virali
<i>Linfociti (Linf)</i>	Stimolazione cronica da agenti esterni (actinomicosi, brucellosi, babesiosi e pneumocisti	Patologie batteriche acute, stress, somministrazione di corticosteroidi, sindromi da immunodeficienza
<i>Monociti (Mono)</i>	Lesioni infiammatorie, setticemia miocarditi e lesioni piogranulomatose	
<i>Eosinofili (Eos)</i>	Somministrazione di farmaci tetracicline reazioni da ipersensibilità, forme parassitarie, micosi, neoplasie	Somministrazione di corticosteroidi infiammazione acute, stress.

Valori normali nel sangue bovino da Feldman B.F. et al., 2000

WBC (k/μl)	4000	-	12000		
Neutrofili (k/μl)	600	-	4000	Neutrofili(%)	15 - 45
Linfociti (k/μl)	2500	-	7500	Linfociti(%)	45 - 75
Monociti (k/μl)	25	-	840	Monociti(%)	2 - 7
Eosinofili (k/μl)	0	-	2400	Eosinofili(%)	0 - 20
Basofili (k/μl)	0	-	200	Basofili(%)	0 - 2

Piastrine

Funzione biologica: le piastrine sono gli elementi figurati del sangue che hanno la funzione principale di controllare il processo coagulativo e riparativo dei tessuti. Sono prodotte dal midollo osseo.

Interpretazione: la piastrinosi è secondaria a emorragie. La piastrinopenia invece è secondaria a forme autoimmunitarie o a scarsa produzione midollare.

Valori normali (K/ul) delle piastrine nel sangue bovino da Feldman B.F. et al., 2000 :
Bovini 300 - 800

BIBLIOGRAFIA

- 1) *Manuale di Impiego CELL-DYN 3500 System della Abbott Divisione Diagnostica.*
- 2) *Diagnostica Clinica dei piccoli animali e referti di laboratorio.* M.D. Willard et al. Ed. SBM 1980
- 3) AGUGGINI G., BEGHELLI V., GIULIO L.F. (1992). *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia*, UTET, IT, pp 311-356
- 4) BEZZILLE P. (1994). *Conta e formula leucocitaria nei bovini.* *Summa veterinaria*, 3, pp 19-21
- 5) COLLIN E. (2000). *Gli esami ematici nel bovino 2 – Utilizzo pratico dell'ematologia - Summa Veterinaria*, 6, pp 59-64.
- 6) DELL'ORTO V., SGOIFO ROSSI C.A. (1998). *La fase di adattamento del bovino da carne da ristallo.* *L'informatore agrario*, 40, pp 45-53
- 7) FELDMAN B.J., ZINKL J., G, JAIN N.J.(2000). *Schalm's Veterinary Hematology Fifth Edition*, Lippincott Williams & Wilkins London, UK, pp 105-116, 178-183, 196-209, 391-404, 894-895
- 8) FIORETTI M., BERTOLI S., BERTOLI M., (1990). *Diagnostica in medicina veterinaria. Attualità in laboratorio.* Edi-ermes Milano, IT
- 9) HAWKEY C.M., DENNET T.B. (1989). *Comparative Veterinary Haematology.* Wolfe Publishing Limited London, UK, pp 9-147
- 10) KANEKO J.J., HARVEY W.J., BRUSS M.L. (1997) *Clinical biochemistry of domestic animals.* Academic press fifth edition, USA, pp 157-194.
- 11) RAVAROTTO L., DALVIT P., PARENTI E., BETTIO M., BARBERIO A., MARANGON S., (2000). *Studio di alcuni parametri biochimici ed ematologici nel vitellone di razza Charolaise.* *La selezione veterinaria*, S233-S242
- 12) UBALDI A., CORBELLA E., MONTANARI P. (1982). *Diagnostica chimico-clinica veterinaria.* Casa editrice Ambrosiana Milano, IT, pp 17- 32, 44-198
- 13) VERRIELE M., BEDOUET J. (2000). *Gli esami ematici nei bovini 1. Le chiavi per utilizzare la biochimica clinica.* *Summa Veterinaria*, 5, pp 27-31

GIANFRANCO BRAMBILLA, ALFREDO BALLERINI,
CINZIA CIVITAREALE, MAURIZIO FIORI.

LA MISURAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO
NEL BOVINO DA CARNE
AI FINI DELLA VALUTAZIONE DEL BENESSERE

Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio Medicina Veterinaria,
Viale Regina Elena, 299 I 00161 Roma . tel + 39 06 4990 3060; e mail: g.brambi@iss.it

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono molecole classificate come radicali liberi a causa della presenza di un elettrone spaiato, e appunto per questo in grado di interagire in frazioni infinitesimali di tempo con altre molecole; tra le più importanti ricordiamo: lo ione superossido (O_2^-), l'ossido nitrico (NO) ed il radicale idrossido (HO^-).

I ROS sono presenti fisiologicamente nell'organismo ed in condizioni di benessere risultano essere contenuti in specifici compartimenti cellulari. La loro limitata presenza in circolo in condizioni di benessere, viene controbilanciata da molecole naturali a capacità antiossidante quali il glutatione, la glutatione perossidasi, la Superossido dismutasi (SOD), il Coenzima q, le vitamine E e C, che agiscono come spazzini dei radicali liberi, con meccanismi di delocalizzazione dell'elettrone spaiato (es, vitamina E) o di ossidoriduzione (es Vitamina C, Glutatione).

In presenza di ossigeno, i ROS sono responsabili dell'iniziazione del processo di perossidazione lipidica. Tale processo è di natura radicalica, con un meccanismo di propagazione che, qualora non sufficientemente tamponato dal potere antiossidante (PAO), costituito dal pannello di molecole sopra ricordate, porta al progressivo degradamento ed alla totale distruzione delle membrane cellulari responsabili della loro compartimentalizzazione e quindi causa l'amplificazione a cascata del fenomeno.

Tale reazione a cascata nei suoi stadi iniziali comporta la formazione di radicali perossidici e di idroperossidi, estremamente stabili e quindi dosabili sia nei tessuti che nel sangue, denominati convenzionalmente Metaboliti Reattivi dell'Ossigeno (ROMs).

I ROMs, a loro volta, possono portare all'ossidazione di molecole nobili, quali gli acidi nucleici, le proteine, e gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) ed alla formazione di radicali idrossile (HR), che includono lipoperossidi, che, nelle fasi terminali del processo di ossidazione, portano alla formazione di malonaldeide.

Il dosaggio dei ROMs e del potere anti-ossidante nel siero, è già stato studiato in medicina umana quale parametro sensibile in corso di danno cellulare, che si verifica in alcune patologie cronico-degenerative quale l'Alzheimer, nel corso di malattie metaboliche, quali il Diabete. Negli atleti, un innalzamento si ha in corso di esercizi anaerobiotici, o quale conseguenza di sforzi prolungati, quali la maratona o gare di gran fondo.

Volendo schematizzare, un innalzamento dei valori di ROMs, ed una possibile risposta adattativa con un aumento del corredo anti-ossidante nel siero si possono verificare in corso di:

- apporto di ossigeno insufficiente ai tessuti mediante il sistema cardiocircolatorio
- insufficienza respiratoria, che determina ipossia nei tessuti
- presenza di fenomeni infiammatori, con rilascio dei ROS da parte dei leucociti
- malattie metaboliche, comprese le encefalopatie, che comportano danno tissutale
- trattamenti con farmaci ad azione anabolizzante ed in generale acceleranti il metabolismo basale (ormone della crescita, ormoni della tiroide), che comportano un aumentato consumo di ossigeno nella catena respiratoria.

- alimentazione con presenza di fattori pro-ossidanti (es. micotossine, metalli bivalenti, lipidi perossidati, fattori anti-vitaminici) e/o con carenza di fattori anti-ossidanti (vitamina C, vitamina E)
- esposizione a distruttori endocrini, in grado di dereprimere in modo notevole la sintesi proteica.

A differenza della clinica umana, e dei piccoli animali, indirizzata alla valutazione del singolo individuo, nel campo degli animali da reddito l'applicazione dei test atti a valutare lo stress ossidativo riveste fondamentalmente uno scopo di diagnosi di popolazione. Ovverosia, si procede alla verifica dell'esistenza in un campione rappresentativo della popolazione bovina di una causa collettiva e non individuale in grado di condizionare i livelli basali di ROMs e di PAO; tale causa collettiva è da ricondursi principalmente all'alimentazione, alla selezione genetica, alla conduzione della stalla.

L'attendibilità del risultato ai fini della valutazione del benessere animale comporta, tuttavia, che si escludano su base anamnestica, clinica, laboratoristica, anatomo-patologica e ispettiva altre cause di innalzamento dei ROMs, quali ad esempio processi infiammatori in atto. A tale proposito è corretto condurre l'esame dei ROMs e del PAO in maniera parallela all'esame ematologico, in modo da evidenziare attraverso l'esame dei risultati della serie rossa e della serie bianca stati anemici che possano indurre ipossia dei tessuti, o processi infiammatori di natura batterica e/o virale.

Un aspetto rilevante è costituito dalla valutazione comparata dei valori di ROMs e PAO. Un innalzamento dei primi, non seguito da una risposta adattativa del potere antiossidante è da considerarsi un aspetto negativo, in quanto rappresenta la mancata risposta adattativa dell'organismo allo stress ossidativo. In termini anglosassoni, la correlazione tra ROMs e PAO permette di discriminare tra stress e distress. Tale situazione di distress è già stata verificata su base biochimica-clinica nelle linee genetiche di suini, suscettibili alla Porcine Stress Sindrome e alla Mulberry Heart Disease.

Per concludere, la valutazione sistematica dello stress ossidativo a livello di stalla può quindi avere le seguenti ricadute in termini di sanità pubblica veterinaria:

- Valutazione del benessere animale in allevamento o in seguito a trasporto, per misurare sia situazioni di stress acuto, (innalzamento ROMs, senza risposta adattativa APO), sia situazioni di stress cronico con e senza risposta adattativa.
- Supporto tecnico-scientifico allo sviluppo della legislazione in materia di benessere animale, laddove risulti opportuno specificare determinati parametri biochimico-clinici
- Indicatore di trattamenti di massa illeciti ad azione ormonale
- Indicatore di esposizione di massa a contaminanti ambientali
- Supporto alle attività complementari nel campo dei Piani Nazionali Residui e Alimentazione Animale
- Marker di patologia denegerativa a livello di SNC, applicabile alla diagnosi pre-clinica delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili.
- Supporto indiretto ai piani di profilassi/eradicazione di malattie a sfondo degenerativo / metabolico

BIBLIOGRAFIA

- 1) O. MILHAVET, H. E.M. MCMAHON, W. RACHIDI, N. NISHIDA, S. KATAMINE, A. MANGÈ, M. ARLOTTO, D. CASANOVA, J. RIONDEL, A. FAVIER AND S. LEHMAN. *Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress*. PNAS n° 25, vol 97: 13937 - 13942 (2000).
- 2) N. KIM, S. PARK, J. JIN, M. KWON, E. CHOI, R. I. CARP, Y. *Kim Increased ferric iron content and iron-induced oxidative stress in the brains of scrapie-infected mice*. Brains research 884: 98-103 (2000).
- 3) G. BRAMBILLA, M. FIORI AND L.I. ARCHETTI *Evaluation of the Oxidative Stress in Growing Pigs by Microplate Assays*. J. Vet. Med 48: 33-38 (2001).
- 4) A. FORMIGONI, D. CALDERONE, P. PEZZI E A. PANCIROLI. *Evoluzione dello "status ossidativo" nella bovina da latte: osservazioni preliminari*. Atti XII Congresso nazionale ASPA 203 - 204 (giugno 1997).
- 5) C. KUSMIC, C. PETERSEN, E. PICANO, C. BUSCETI, G. PARENTI, F. LANGHI PASINI AND R. BARSACCHI *Antioxidant Effect of Oral During Cerebral Hypoperfusion with Human Carotid Endarterectomy*. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 36: 141-145 (200).
- 6) D. W. LEE, H. O. SOHN, H. B. LIM, Y. G. LEE, Y. S. KIM, R. I. CARP AND H. M. WISNIEWSKI. *Alteration of Free Radical Metabolism in the Brain of Mice Infected with Scrapie Agent*. *Free Radical Res.* 30: 499-507 (1999).
- 7) C. W. OLANOW *A radical Hypothesis for neurodegeneration*. TINS n° 11, vol. 16: 439-443 (1993)
- 8) D. J. WAGGONER, B. DRISALDI, T. B. BARTNIKAS, R. LEACH, B. CASARENO, J. R. PROHASKA, J. D. GITLIN AND D. A. HARRIS BRAIN. *Copper Content and Cuproenzyme Activity Do Not Vary with Prion Protein Expression Level*. *The Journal of Biological Chemistry* n° 11, vol. 275: 7455-7458 (2000).
- 9) P. JENNER. *Oxidative damage in neurodegenerative disease*. *The Lancet* 334: 796-798 (1994)
- 10) M. R. EMERSON AND S. M. LeVine *Heme Oxygenase-1 and NADPH Cytochrome P450 Reductase Expression in Experimental Allergic Encephalomyelitis: An Expanded View of the Stress Response*. *Journal of Neurochemistry* n° 6, vol. 75: 2555-2562 (2000).
- 11) D. R BROWN, C. CLIVE AND S. J. HASWELL. *Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein*. *Journal of Neurochemistry* 76: 69-76 (2001)
- 12) P. PONTIGGIA, M. G. SILVOTTI, F. MARTANO, F. CUPPONE CURTO, G. B. ROTELLA, *A Sabato The role of whole body hiperthermia in AIDS patients: effects on the free radicals level*. *Med. Biol. Environn.* 23: 279-282 (1995).
- 13) B. HALLIWELL *free Radicals and Antioxidants: A Personal View*. *Nutrition Reviews* n° 8, vol. 52: 253-265 (1994)
- 14) R. WILSON, R. SMITH, P. WILSON, M. J. SHEPHERD AND R.A. Riemersma *Quantitative Gas Chromatography-Mass Spectrometry Isomer-Specific Measurement of Hydroxy Fatty Acids in Biological Samples and Food as a Marker of Lipid Peroxidation*. *Analytical Biochemistry* 248: 76-85 (1997)

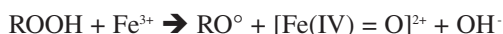
PROCEDURE OPERATIVE PER LA MISURAZIONE DI ROMS NEL SIERO DI BOVINI

SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente metodo si propone di dosare i Metaboliti Reattivi dell'Ossigeno (ROMs) nel siero bovino, quali prodotti precoci e stabili del processo a cascata di ossidazione dei substrati biologici, mediante un saggio colorimetrico basato sulla reazione di Fenton (ossidazione da Fe^{2+} a Fe^{3+}).

PRINCIPIO

In presenza di ioni metallici quali Fe^{2+} ed Fe^{3+} gli idroperossidi, portano alla formazione sia di radicali alcossili che di radicali perossili secondo la reazione:



Nell'ambiente di reazione, il destino dei radicali alcossili è quello di dare idrogeno-estrazione da una molecola vicina, formando un nuovo radicale, o di subire una frammentazione con formazione di un composto carbonilico e, di nuovo, di un radicale.

Le nuove specie radicaliche propagano poi la catena autossidativa. Anche i radicali perossili, seppur in modo meno efficiente, possono dar luogo ad una estrazione di idrogeno da molecole vicine; inoltre se presenti in concentrazione sufficiente possono dimerizzare formando tetrossidi precursori di altri radicali alcossili e, se insaturi, possono ciclizzare portando alla formazione finale di endoperossidi.

In presenza di sostanze facilmente ossidabili, sia i radicali alcossili che quelli perossili possono essere coinvolti in processi di trasferimento monoelettronico che risultano dalla formazione dei corrispondenti anioni. Il risultato viene espresso in termini di idroperossido-equivalenti.

La misurazione dei ROMs si basa sulla rilevazione spettrofotometrica dell'aumento dell'intensità di colorazione rossa che si sviluppa quando un piccolo campione di siero di sangue viene aggiunto ad una soluzione di N,N-dietil-para-fenilen diammina (cromogeno) tamponata a pH 4.8, con un picco massimo di assorbanza a 505 nm e direttamente proporzionale alla concentrazione dei derivati dei metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROMs) presenti nel campione.

In particolare la comparsa della colorazione è attribuita alla formazione del radicale catione dell'ammina che si formerebbe grazie all'azione dei radicali alcossili e perossili derivati dalla reazione degli idroperossidi presenti nel campione di siero con gli ioni Fe^{2+} ed Fe^{3+} rilasciati dalle proteine nell'ambiente acido.

MATERIALI E METODI

Materiali

Eppendorf da 1,5 ml sterili	Lettore spettrofotometrico per micropiastre
Micropipette da 5 - 250 μ l	Siero di riferimento
Micropiastre a fondo piatto da 96 pozzetti ciascuna	R1 = miscela cromogena (N,N-dietil-parafenilen diammina)
Camera termostata	R2 = tampone acetato (0,1 M, PH 4,8), stabilizzanti e conservanti

Prelievi

Ogni prelievo (almeno 5 ml di sangue) va effettuato utilizzando provette sterili asciutte da 10 ml senza anticoagulante; l'EDTA è un chelante del ferro e per tale motivo ostacola la reazione di Fenton, su cui è basato il saggio colorimetrico.

Il siero deve essere non emolitico, e conservato a + 4° C se analizzato entro 48 ore dal prelievo. Altrimenti, è necessario congelarlo.

Per la diagnosi di allevamento, i sieri devono appartenere ad animali che hanno avuto la stessa alimentazione e lo stesso management di stalla. E' importante che siano della stessa razza.

Determinazione dei Metaboliti Reattivi dell'Ossigeno.

I sieri bovini non diluiti vengono saggiati almeno in doppio.

Preparare una soluzione 1:100 R1/R2.

Dispensare 200 μ l della soluzione R1/R2 in ciascun pozzetto della micropiastre a 96 pozzetti.

Dispensare 5 μ l di siero in ciascun pozzetto della micropiastre a 96 pozzetti bianco reagenti.

Dispensare 200 μ l della soluzione R1/R2.

Dispensare 5 μ l di acqua distillata.

siero di riferimento da utilizzare per la retta di calibrazione.

Dispensare 200 μ l della soluzione R1/R2.

Dispensare 5 μ l di siero di riferimento nelle diluizioni 1: 1 a 1: 16, base 2, (5 punti), in H₂O₂.

Miscelare e incubare a 37°C per 75 minuti.

Lettura: utilizzate uno spettrofotometro per piastre a 96 pozzetti, con filtro a 505 nm.

Il colore sviluppato si mantiene stabile almeno per 30 minuti a temperatura ambiente.

CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il valore di ROMs viene espresso come millimoli di H₂O₂

A tutti i valori di assorbanza dei campioni, compreso il tal quale e le diluizioni per la costruzione della retta di calibrazione va sottratto il valore dell'assorbanza del bianco reagente, che non deve superare il valore di 0,050 OD.

Calcolare la retta di regressione lineare della curva ottenuta per diluizione del siero di riferimento, il cui coefficiente di regressione non deve risultare inferiore in condizioni ottimali a 0.998.

Inserire nell'equazione della retta $y = a + bx$ i valori medi di assorbanza, al netto del bianco reagente, del campione di siero a titolo incognito. Ricavare l'equivalente valore di ROMs, espresso come millimoli di H₂O₂.

In termini di ripetibilità, il Coefficiente di Variazione non deve superare il 2,5% .
In termini di Riproducibilità, il Coefficiente di Variazione non deve superare il 4,0%.
Se uno o più di tali parametri di qualità non fossero rispettati, controllare la corretta dispensazione dei reagenti e la stabilità dei sieri e dei reagenti stessi.

Procedure Operative per la misurazione del Potere Anti Ossidante (PAO) nel siero di bovini

SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Molte sostanze contenute nel plasma agiscono per neutralizzare l'azione lesiva dell'eccesso di radicali liberi che via via si producono dal metabolismo cellulare. Oltre ai componenti che normalmente hanno azione riducente, quali le vitamine, l'acido urico, il GSH, altre molecole come le proteine, il colesterolo, i gruppi tiolici divengono elementi utilizzabili in presenza dell'azione del radicale ossidrilico OH o dell'acido ipocloroso.

PRINCIPIO

Sottoponendo il siero ad una massiccia ossidazione, da parte di una soluzione a titolo noto di acido ipocloroso, e misurando successivamente l'eccesso dello stesso nel sistema, siamo in grado di determinare l'efficacia del pannello di sostanze antiossidanti che è in grado di contrapporsi all'azione lesiva dei radicali liberi. L'eccesso di ossidazione non neutralizzato dal potere antiossidante del siero, viene rilevato spettrofotometricamente, nel visibile, mediante reazione colorimetrica.

MATERIALI E METODI

Materiali

Eppendorf da 1,5 ml sterili	Letto spettrofotometrico per micropiastre
Micropipette da 5 - 250 µl	Siero di riferimento
Micropiastre a fondo piatto da 96 pozzetti ciascuna	R1 = Soluzione ossidante di Acido Ipocloroso a titolo noto
Camera termostata	R2 = miscela cromogena (N,N-dietil-para-fenilen diammina)

Prelievi

Ogni prelievo (almeno 5 ml di sangue) va effettuato utilizzando provette sterili asciutte da 10 ml senza anticoagulante; l' EDTA è un chelante del ferro e per tale motivo ostacola la reazione di Fenton, su cui è basato il saggio colorimetrico.

Il siero deve essere non emolitico, e conservato a + 4° C se analizzato entro 48 ore dal prelievo. Altrimenti, è necessario congelarlo.

Per la diagnosi di allevamento, i sieri devono appartenere ad animali che hanno avuto la stessa alimentazione e lo stesso management di stalla. È importante che siano della stessa razza.

Metodi

Procedere ad una diluizione dei sieri in esame 1:100 con H₂O, da saggiarsi preferibilmente almeno in doppio. Il siero di riferimento, viene diluito in base 2, partendo da 1:50, fino ad 1: 800, per un totale di 5 punti di calibrazione. Dispensare 200 µl di soluzione R1

Dispensare 5 µl di campione in esame diluito 1:100

Per il Bianco reagente: 200 µl di R1 + 5 ml di acqua distillata

Agitare bene e lasciare a temperatura ambiente per 10 minuti

Aggiungere 5 µl di R2 in tutti i pozzetti. Agitare delicatamente per 30 secondi e procedere alla lettura.

Lettura

utilizzate uno spettrofotometro per piastre a 96 pozzetti, con filtro a 505 nm.

Il colore sviluppato si mantiene stabile almeno per 30 minuti a temperatura ambiente.

CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

I risultati vengono espressi come µM HClO neutralizzate dal siero in esame.

Bisogna tenere conto del fattore di diluizione 1:100 dei sieri

A tutti i valori di assorbanza dei campioni, comprese le diluizioni per la costruzione della retta di calibrazione va sottratto il valore dell'assorbanza del bianco reagente, che non deve superare il valore di 0,050 OD.

Calcolare la retta di regressione lineare della curva ottenuta per diluizione del siero di riferimento, il cui coefficiente di regressione non deve risultare superiore a 0.998

Inserire nell'equazione della retta $y = a + bx$ i valori medi di assorbanza, al netto del bianco reagente, del campione di siero a titolo incognito. Ricavare l'equivalente valore di PAO, espresso come micromoli di HClO neutralizzate

In termini di ripetibilità, il Coefficiente di Variazione non deve superare il 3,0%.

In termini di Riproducibilità, il Coefficiente di Variazione non deve superare il 4,5%.

Se uno o più di tali parametri di qualità non fossero rispettati, controllare la corretta dispensazione dei reagenti e la stabilità dei sieri e dei reagenti stessi.

Valori indicativi di riferimento di ROMS e PAO in differenti tipologie di bovini da carne, clinicamente sani e con valori ematologici nella norma. Intervalli di confidenza espressi come 95% percentili, presupponendo una distribuzione normale.

<i>Tipologia</i>	<i>Età</i>	<i>N</i>	<i>ROMs*</i>	<i>PAO**</i>	<i>ROMs/PAO***</i>
<i>Vitelli a carne bianca alimentati con latte ricostituito</i>	30 gg	42	0,62 – 1,04	163 - 222	0,0042
<i>Vitelli scolestrati sotto madre</i>	30 gg	67	1,46 – 2,57	282- 330	0,0069
<i>Vitelli a carne bianca in box collettivo</i>	150 gg	42	1,54 – 2,55	258 - 323	0,0070
<i>Vitelli allevati al pascolo, con vacca nutrice</i>	150 gg	67	0,34 – 0,68	182 - 217	0,0026
<i>Vitelli a carne bianca positivi per anabolizzanti</i>	150 gg	23	2,61 – 3,21	265 - 336	0,0096
<i>Vitelloni marchigiani al pascolo</i>	340 gg	13	0,62 – 0,81	172 - 204	0,0037
<i>Vitelloni da ingrasso di importazione</i>	340 gg	120	1,05 – 1,53	210 - 250	0,0054

Espressi come milliMoli H₂O₂

** Espresso come microMoli HClO neutralizzate

*** Rapporto calcolato sui valori medi

DOTT.SSA PAOLA BERTOLIN - - DOTT. MARCO BORTOLUZZI
DOTT.SSA LICIA RAVAROTTO

ANALISI DEI PARAMETRI CHIMICO-CLINICI IMPIEGATI QUALI INDICATORI DI BENESSERE ANIMALE

Istituto Zooprofilattico delle Venezie
Laboratorio di Analisi Chimico-cliniche dell' Area di Igiene dell' Ambiente e delle Produzioni Zootecniche
Responsabile: Dott.ssa Licia Ravarotto

ANALISI BIOCHIMICHE

Proteine totali

Funzione biologica

Le proteine sono importanti componenti del plasma, costituite dalle albumine e dalle gammaglobuline. Svolgono funzione immunitaria e di trasporto di composti non proteici, principalmente ormoni, metalli ed emoglobina.

Interpretazione

La concentrazione delle proteine ematiche può essere in eccesso (iperproteinemia) o in difetto (ipoproteinemia).

L'iperproteinemia può essere conseguente a disidratazione, vomito o a plasmocitoma.

Condizioni di ipoproteinemia sono invece correlate a grave insufficienza epatica, a insufficienza renale, enteropatie, malassorbimento e malnutrizione.

Valori normali nel plasma bovino (g/l), Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 50-82

Vitelloni Charolaise di 600-650kg (12-14 mesi): 63-93

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue intero in Li-eparina

Principio del metodo: biuretto con bianco campione.

Sistema analitico: analizzatore biochimico automatico Roche BM Hitachi 911, kit Roche TP cod. 1553836

Albumine

Funzione biologica

Le albumine, prodotte dal fegato, sono componenti fondamentali delle proteine totali. Determinano la pressione colloidale e hanno funzione di trasporto di ormoni, metalli e di diverse altre molecole.

Interpretazione

Situazioni di iperalbuminemia possono essere correlate con stati di disidratazione di diversa origine. Stati di ipoalbuminemia sono invece riconducibili ad epatopatie, sindrome nefrosica, enteropatie e malnutrizione.

Valori normali nel plasma bovino (g/l), da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 25-40

Vitelloni Charolaise di 600-650kg (12-14 mesi): 31-41

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: verde di bromocresolo

Sistema analitico: analizzatore biochimico automatico Roche BM Hitachi 911, kit Roche ALB plus cod.1970569

Gammaglobuline

Funzione biologica

Le gammaglobuline sono rappresentate dalla frazione anticorpale plasmatica e costituiscono un'importante componente delle proteine totali. Hanno quindi funzione di difesa dell'organismo di tipo sistemico (IgG) e mucosale (IgA).

Interpretazione

La concentrazione di gammaglobuline plasmatiche è correlata all'attività del sistema immunitario dell'organismo considerato. Si possono avere forme di ipogammaglobulinemia secondarie a patologie immunodepressive organiche o in relazione a stati di stress (stress ambientale o stress sociale). Un aumento di gammaglobuline è concomitante all'insorgenza d'infezioni o ad interventi vaccinali recenti.

Valori normali nel plasma bovino (g/l), da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 22-51

Vitelloni Charolaise di 600-650 kg (12-14 mesi): 29-62

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: calcolato (differenza tra le concentrazioni delle proteine totali e delle albumine)

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911, kit Roche TP cod. 1553836 e kit Roche ALB plus cod.1970569

Azoto ureico

Funzione biologica

Nei mammiferi l'urea costituisce il principale catabolita azotato delle proteine e viene eliminata principalmente attraverso il rene. Si forma nel fegato, dalla deaminazione degli amminoacidi attraverso il ciclo dell'urea. Nei ruminanti è il parametro più importante del metabolismo proteico, perché correlato con la funzionalità ruminale ed epatica.

Interpretazione

I valori ematici dell'urea possono discostarsi dalla norma o per eccesso o per difetto. Condizioni di iperazotemia sono legate a dieta iperproteica, emocoagulazione, ipertiroidismo, ustioni, emorragie, ascessi, emolisi, ipertensione, insufficienza renale e disturbi emodinamici. Stati di ipoazotemia sono invece riconducibili a diete ipoproteiche, ipotiroidismo e grave insufficienza epatica. Nei ruminanti le modificazioni della concentrazione di urea

sono spesso correlate al tipo di dieta somministrata all'animale, in particolar modo al rapporto esistente tra proteina alimentare ed energia: eccesso di proteine nella razione, la presenza di proteine ad elevata degradabilità ruminale o comunque di scarso valore biologico, determinano un incremento del livello di urea ematica fino a valori considerati tossici per il bovino (superiori a 6.5 mmol/l).

Valori normali nel plasma bovino (mmol/l), da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 1.0-6.3

Vitelloni Charolaise di 600-650 kg (12-14 mesi): 1.6-6.3

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: ureasi, GLDH

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911, kit Roche UREA/BUN cod.1489364

Glucosio

Funzione biologica

Nei monogastrici il glucosio costituisce la fonte energetica fondamentale utilizzata per lo svolgimento delle più importanti funzioni biologiche (ossidazione biologiche, contrazioni muscolari, metabolismo del sistema nervoso centrale, ecc.). L'organismo dispone di modeste riserve di glucosio di cui la principale è costituita dal glicogeno depositato nel fegato. Nei ruminanti invece il glucosio non è primariamente utilizzato come fonte energetica, in quanto l'alimento, modificato dal rumine, determina la produzione di acidi grassi volatili (AGV), quali acido propionico e butirrico, impiegati nella gluconeogenesi.

Interpretazione

Il glucosio ematico può essere aumentato qualora si verificano condizioni di diabete mellito, ipercorticossurrenalismo (sindrome di Cushing), ipertiroidismo, shock, traumi e pancreatite acuta. L'ipoglicemia può invece derivare da malassorbimento e da sindrome epatorenale. Nei ruminanti la quantità di energia della razione assume particolare significato nell'insorgenza di forme dismetaboliche quali acidosi, meteorismo e chetosi.

Valori normali nel plasma bovino (mmol/l), da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 2.0-7.5

Vitelloni Charolaise di 600-650 kg (12-14 mesi): 2.8-6.2

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: esochinasi

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911, kit Roche GLU cod.1447513

Colesterolo

Funzione biologica

Il colesterolo costituisce oltre un terzo dei lipidi sierici, viene metabolizzato dal fegato a partire dall'acido acetico. Partecipa alla sintesi degli acidi biliari, degli ormoni sessuali e degli

ormoni della corteccia surrenale.

Viene veicolato da lipoproteine in particolare da quelle del genere alfa e beta.

Interpretazione

Condizioni di ipercolesterolemia sono di solito secondarie a diabete mellito, ittero da stasi e sofferenza epatocellulare. L'ipocolesterolemia deriva invece da epatopatie gravi, ipertiroidismo, anemie, stati cachettici, gravi infezioni e malnutrizione. Nei bovini l'aumento dei livelli di colesterolo può essere utilizzato come indicatore di lipomobilizzazione.

Valori normali nel plasma bovino (mmol/l), da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 0.82-3.27

Vitelloni Charolaise di 600-650 kg (12-14 mesi): 1.70-4.24

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: CHOD, PAP

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911, kit Roche CHOL, cod.1489232

Trigliceridi

Funzione biologica

I trigliceridi derivano dalla combinazione di un alcool con molecole di acidi grassi, attraverso una reazione di esterificazione, che si verifica a livello epatico. Rappresentano la forma in cui i grassi vengono immagazzinati nel tessuto adiposo.

Interpretazione

Per quanto riguarda i livelli ematici dei trigliceridi da un punto di vista clinico assume importanza soltanto la condizione detta di iperlipidemia. Essa si verifica in relazione a situazioni di digiuno, malassorbimento o pancreatiti. Nei bovini tale parametro è strettamente correlato alla categoria produttiva e alla presenza di grassatura nella razione.

Valori normali nel plasma bovino (mmol/l) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 0.07-0.31

Vitelloni Charolaise di 600-650kg (12-14 mesi): 0.06-0.43

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: lipasi, GPO, PAP

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911 kit Roche, kit Roche TG cod. 1488872

Acidi grassi non esterificati (NEFA)

Funzione biologica

I NEFA costituiscono i cosiddetti acidi grassi non esterificati. Questi derivano dalla lipomobilizzazione dei grassi di riserva. La loro concentrazione è determinante nel modificare la funzionalità epatica. Normalmente presenti nel sangue a basse concentrazioni, sono rimossi dal tessuto adiposo e vanno al fegato dove vengono trasformati in corpi chetonici (acetone, acido

aceto-acetico e β - idrossi- butirrato) utilizzati a scopo energetico.

Interpretazione

La concentrazione plasmatica dei NEFA è utilizzata come indicatore di stati di chetosi tipici nei bovini, ed in particolar modo nella bovina da latte subito dopo il parto .

Condizioni di stress possono aumentarne ugualmente la concentrazione ematica, in quanto l'elevarsi della cortisolemia determina incremento della lipolisi.

Valori normali nel plasma bovino (meq/l) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 0.01-0.36

Vitelloni Charolaise di 600-650kg (12-14 mesi): 0.01-0.64

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: acetilCoA ossidasi, perossidasi, TOOS

Sistema analitico: kit Randox cod. 9420 impiegato secondo istruzioni manuali

Bilirubina totale, diretta ed indiretta

Funzione biologica

La bilirubina deriva direttamente dal metabolismo dell'emoglobina a seguito della rottura della stessa e della liberazione del ferro. La bilirubina così formata passa in circolo legata all'albumina, ed è definita bilirubina non coniugata o indiretta. Essa giunge al fegato dove viene coniugata all'acido glucuronico, per essere poi escreta con la bile. Questa frazione è definita bilirubina coniugata o diretta.

Interpretazione

L'aumento o la diminuzione della bilirubina totale è in relazione alle modificazioni delle rispettive frazioni.

L'aumento della concentrazione della bilirubina indiretta è generalmente secondario ad anemie di tipo emolitico di diversa origine (immunitaria, tossica, infettiva o chimica). L'aumento della bilirubina diretta, è invece imputabile a patologie specifiche del fegato, quali epatite acute, itteri da occlusione extra od intraepatica o atrofia gialla acuta.

Valori normali nel plasma bovino ($\mu\text{mol/l}$) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi):

Bilirubina totale 4.24 - 20.02

Bilirubina indiretta 2.82 - 10.19

Bilirubina diretta 0.65 - 15.49

Vitelloni Charolaise di 600-650 kg (12-14 mesi):

Bilirubina totale 3.87 - 26.17

Bilirubina indiretta 0.91 - 10.68

Bilirubina diretta 0.65 - 15.49

Esecuzione dell'analisi:

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: Bilirubina totale: DPD

Bilirubina diretta: Jendrassik-Grof

Bilirubina indiretta: calcolato (differenza tra le concentrazioni

di bilirubina totale e diretta)
Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911, kit Roche BIL-T (Bil. Totale) cod. 1489194, kit Roche D-BIL (Bil. Diretta) cod. 1109774

Creatinina

Funzione biologica

La creatinina è un composto azotato non proteico che deriva dal metabolismo delle proteine, è direttamente assorbito dal sangue e completamente eliminato per via glomerulare. La sua determinazione ematica è quindi direttamente correlabile alla funzionalità renale.

Interpretazione

Dal punto di vista clinico solo l'aumento della creatinina ematica ha significato. L'aumento della creatinemia è generalmente imputabile a prolungati sforzi muscolari, a ipertiroidismo, ad insufficienza glomerulare, a nefriti acute o croniche, e a sindrome uremica.

Valori normali nel plasma bovino (mmol/l) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 93 – 222
Vitelloni Charolaise di 600-650kg (12-14 mesi): 107 - 229

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina
Principio del metodo: enzimatico, PAP
Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911, kit Roche CREA plus, cod. 1775642

Aspartato transaminasi (AST)

Funzione biologica

Questa transaminasi è localizzata per il 50% nel citoplasma e per il 50% nei mitocondri sia degli epatociti sia dei miociti. La sua concentrazione ematica aumenta ogni qualvolta sia indotta la lisi cellulare (fenomeni tossici, infettivi, infiammatori).

Interpretazione

La determinazione dell'attività plasmatica dell'AST è utile nella diagnosi di patologie epatiche e cardiache e nelle miopatie di diversa origine.

Valori normali nel plasma bovino (U/l) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 100 - 160
Vitelloni Charolaise di 600-650kg (12-14 mesi): 49 - 126

Esecuzione dell'analisi:

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina
Principio del metodo: tampone tris (IFCC) senza P5P, 37° C
Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911 kit Roche AST (ASAT/GOT), cod. 851124

Alanina amino transferasi (ALT)

Funzione biologica

Questa transaminasi è localizzata prevalentemente a livello del citoplasma delle cellule epatiche, tuttavia non è un enzima epatospecifico in quanto piccole quantità risultano presenti anche a livello della muscolatura striata.

Interpretazione

La determinazione dell'attività plasmatica dell'ALT è utile nella diagnosi di patologie epatiche, quali epatiti infettive, epatiti tossiche, ittero colestatico e nelle miocardiopatie.

Valori normali nel plasma bovino (U/I) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 5 - 40

Vitelloni Charolaise di 600-650kg (12-14 mesi): 11 - 33

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: tampone tris (IFCC) senza P5P', 37° C

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911, kit Roche ALT (ALAT/GPT), cod. 851132

Fosfatasi alcalina (ALP)

Funzione biologica

La fosfatasi alcalina è presente in tutti i tessuti ed organi, ma in particolare nel fegato, nelle ossa, nel duodeno, negli eritrociti, nei leucociti e nella placenta. Questo enzima catalizza la sintesi e la scissione idrolitica degli esteri fosforici a pH alcalino.

Interpretazione

La determinazione dell'attività plasmatica dell'ALP è utile nella diagnosi di patologie a carico dell'apparato scheletrico quale il rachitismo, l'osteomalacia e i tumori dello stesso. L'attività dell'ALP aumenta nell'ittero postepatico, in affezioni pancreatiche, nelle enteriti e nel diabete mellito. Negli animali giovani, i livelli ematici della fosfatasi alcalina sono fisiologicamente superiori a quelli riscontrabili negli adulti.

Valori normali nel plasma bovino (U/I) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 90- 629

Vitelloni Charolaise di 600-650 kg (12-14 mesi): 157 - 866

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: SCE, DGKC, 37° C

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911, kit Roche ALP cod. 816388

Gamma-glutamyl-transpeptidasi (GGT)

Funzione biologica

La GGT è un enzima prevalentemente legato alla membrana cellulare dove ha la funzione

di trasportatore di amminoacidi.

Interpretazione

La GGT è un indicatore particolarmente sensibile dell'esistenza di processi patologici primitivi o secondari del parenchima epatico; il suo incremento è direttamente correlato a patologie a carico del fegato e delle vie biliari. Nei bovini il suo incremento potrebbe essere riconducibile a infestazione da Fasciola hepatica.

Valori normali nel plasma bovino (U/I) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 8 - 24

Vitelloni Charolaise di 600-650 kg (12-14 mesi): 10 - 47

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: g-glutamyl-3Cp-N-anilide, 37° C

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911, kit Roche GGT, cod. 1662473

Lattico deidrogenasi (LDH)

Funzione biologica:

La LDH è un enzima ubiquitario localizzato nel citoplasma cellulare. In particolare le sue forme isoenzimatiche sono presenti nel siero e in tessuti quali il rene, il fegato, la milza, il pancreas, l'intestino.

Interpretazione

La determinazione dell'attività plasmatica dell'LDH, è utile nella diagnosi di patologie epatiche (sia infiammatorie che tossiche), cardiopatie ed emopatie. E' considerato un indicatore di stress per l'innalzamento dei valori relativi alle frazioni isoenzimatiche relative alla muscolatura scheletrica e al fegato.

Valori normali nel plasma bovino (U/I) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 1492 - 4411

Vitelloni Charolaise di 600-650 kg (12-14 mesi): 1624 - 5260

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: piruvato tampone fosfato (DGKC), 37° C

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911, kit Roche LDH, cod.1489305

Creatin-chinasi (CK)

Funzione biologica

Enzima specifico della muscolatura scheletrica, del tessuto celebrale e del miocardio.

Interpretazione

L'incremento dell'attività plasmatica del CK è legato a patologie della muscolatura schele-

trica e cardiaca in maniera specifica. Traumi meccanici, miositi, lesioni podali o interventi chirurgici sono le cause che più frequentemente determinano incremento plasmatico della creatin-chinasi. Prelievi ematici condotti in condizioni particolarmente stressanti (come quelli che prevedono la cattura e il contenimento dell'animale) possono essere causa di incremento del CK.

Valori normali nel plasma bovino (U/l) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 49 - 954

Vitelloni Charolaise di 600-650 kg (12-14 mesi): 61 - 801

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: NAC attivato, 37°

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911 kit Roche CK, cod. 763870

Calcio (Ca)

Funzione biologica

Indispensabile alla formazione della matrice ossea e al suo continuo metabolismo, il calcio riveste un ruolo di primaria importanza nell'eccitazione neuromuscolare ed entra nella formazione dei più importanti substrati organici. Il livello ematico di questo macroelemento è rigidamente controllato dagli ormoni che regolano l'assorbimento intestinale e l'attività di osteoblasti e osteoclasti.

Interpretazione

La concentrazione del calcio plasmatico può essere in eccesso (ipercalcemia) o ridotta (ipocalcemia). L'ipercalcemia si ha a seguito di ipervitaminosi D e A, nefrite cronica interstiziale ed insufficienza surrenalica. L'ipocalcemia è invece conseguenza di malassorbimento, insufficienza epatica, rachitismo, insufficienza renale cronica e nell'intossicazione da fosfati. Ipocalcemia fisiologica si verifica durante la gravidanza e nel periodo post-partum a seguito della lattazione.

Valori normali nel plasma bovino (mmol/l) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 2.04 - 2.70

Vitelloni Charolaise di 600-650 kg (12-14 mesi): 2.21 - 2.74

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: o-Cresoltaleina

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911 kit Roche Ca, cod. 1489216

Fosforo (P)

Funzione biologica

Il fosforo è un elemento di grandissima importanza, è infatti presente in tutte le cellule ed in tutti i liquidi extracellulari e fa parte della matrice inorganica del tessuto osseo e cartilagineo. Partecipa alla regolazione del pH ematico, all'assorbimento renale del sodio e la sua

concentrazione è in equilibrio con la calcemia.

Interpretazione

Possono determinare variazioni della concentrazione del fosforo scompensi ormonali, disvitaminosi, patologie renali, parassitosi ed eccesso di proteine nella razione.

Valori normali nel plasma bovino (mmol/l) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 1.56 - 3.39

Vitelloni Charolaise di 600-650 kg (12-14 mesi): 1.93 - 3.26

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: fosfomolibdato senza riduzione

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911 kit Roche PHOS, cod. 1489348

Magnesio (Mg)

Funzione biologica

Il magnesio è un importante catione che serve a regolare la contrazione muscolare, la pressione arteriosa, nonché l'equilibrio elettrolitico ematico. Nel bovino la magnesemia è principalmente correlata alla quantità apportata con l'alimento e dalla capacità assorbente intestinale.

Interpretazione

L'ipermagnesemia può essere conseguente a una scorretta integrazione, a grave nefropatia o a eccessi di calcio.

Situazioni di ipomagnesemia sono invece conseguenti a eccessi di potassio ed ammoniaca nella razione, ipertiroidismo, sindromi da malassorbimento, diabete, carenze alimentari. Assai nota è la tetania (nella vacca da latte) da ipomagnesemia. In quest'ultimo caso la carenza di Magnesio non permette il rapido riassorbimento di Calcio nelle cellule muscolari scheletriche e quindi la contrazione di esse non s'interrompe (tremori, convulsioni).

Valori normali nel plasma bovino (mmol/l) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 0.65 - 1.17

Vitelloni Charolaise di 600-650 kg (12-14 mesi): 0.74 - 1.23

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: blu di xilene

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911 kit Roche Mg, cod. 1489330

Sodio (Na)

Funzione biologica

Il sodio è il più importante catione dell'organismo, ha localizzazione extracellulare, regola la quantità e la qualità dei liquidi corporei e la pressione osmolare.

Interpretazione

Cause di ipernatriemia possono derivare da emoconcentrazione, intossicazione da corticosteroidi e nefrite acuta. Situazioni di iponatriemia sono invece conseguenti a pleuriti, peritoniti, diabete insipido e diabete mellito, insufficienza renale cronica.

Valori normali nel plasma bovino (mmol/l) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 124 - 147

Vitelloni Charolaise di 600-650 kg (12-14 mesi): 124 - 144

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina
Principio del metodo: potenziometria indiretta
Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911, ISE (elettrodo ione-specifico).

Potassio (K)

Funzione biologica

Il potassio è localizzato a livello intracellulare ed è della massima importanza ai fini dell'omeostasi osmolare e degli scambi idrici intra ed extra cellulari.

Svolge inoltre un ruolo predominante nel fenomeno dell'eccitazione della cellula miocardica e muscolare in genere.

Interpretazione

La concentrazione del potassio può subire incrementi o diminuzioni a livello plasmatico determinati da fattori diversi. L'ipercaliemia può essere secondaria a blocco renale, nefriti acute e subacute, ostruzioni uretrali, shock emodinamico e situazioni di emolisi. L'ipocaliemia può invece derivare da ipercorticossurrenalismo, perdite gastroenteriche, digiuno e diabete insipido.

Valori normali nel plasma bovino (mmol/l) da Ravarotto et.al.,2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 3.9 – 5.1

Vitelloni Charolaise di 600-650kg (12-14 mesi): 3.8 – 5.4

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina
Principio del metodo: ISE: potenziometria indiretta
Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911, ISE (elettrodo ione-specifico)

Cloro (Cl)

Funzione biologica

L'effetto biologico del cloro consiste nell'assicurare l'osmolarità del sangue e dei vari liquidi organici.

Interpretazione

La cloremia può aumentare come conseguenza di nefrite acuta, ostruzione delle vie urinarie ed emorragia intestinale. La diminuzione del cloro plasmatico si verifica invece tutte le volte

che si avviene la perdita di liquidi corporei e soprattutto come conseguenza del vomito.

Valori normali nel plasma bovino (mmol/l) da Ravarotto et. al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 85 - 124

Vitelloni Charolaise di 600-650kg (12-14 mesi): 99 - 113

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: potenziometria indiretta

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911 – utilizzo di reagenti Roche specifici, ISE (elettrodo ione-specifico).

Ferro totale (Fe)

Funzione biologica

Il ferro nei mammiferi è un microelemento presente in varie forme: legato all'emoglobina nel sangue e alla mioglobina nel tessuto muscolare, trasportato dalla ferritina e accumulato nei tessuti (fegato e milza) in depositi di emosiderina. Esso deriva principalmente dalla demolizione degli eritrociti a livello splenico. Tale elemento, trasportato dal gruppo eme dell'emoglobina, è indispensabile per il funzionamento dell'eritropoiesi midollare e ha un ruolo essenziale nel trasporto dell'ossigeno ai tessuti. Il ferro inoltre è coenzima di importanti molecole che intervengono nella catena respiratoria.

Interpretazione

La determinazione della sideremia è fondamentale nell'interpretazione di stati morbosi particolari, quali anemie ed epatopatie.

Valori normali nel plasma bovino (µg/dl) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 29 - 252

Vitelloni Charolaise di 600-650kg (12-14 mesi): 54 - 220

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: ferrozina senza deproteinizzazione

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911, kit Roche Fe, cod. 1970704

Rame (Cu)

Funzione biologica

Il rame è un oligoelemento essenziale nella dieta animale in quanto è presente in enzimi indispensabili come i citocromi, le citocromoossidasi, la catalasi e l'uricasi. Questo microelemento partecipa, in sinergia con il ferro, alla sintesi dell'emoglobina e della mioglobina. Stimola la mobilizzazione delle riserve di ferro epatiche e spleniche, ed interviene nei processi ossidoriduzione.

Interpretazione

La cupremia può subire incrementi qualora si presentino infezioni acute, forme reumatiche, leucemie e patologie cirrotiche. La diminuzione della cupremia è invece conseguenza di

trattamenti con tireostatici o sindrome nefrosica. Nei bovini da carne di nuovo arrivo, lo stress e la presenza di stati patologici determinano un innalzamento del contenuto ematico di rame ed un aumento della sua escrezione renale.

Valori normali nel plasma bovino (mmol/l) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 6.8 – 22.8

Vitelloni Charolaise di 600-650 kg (12-14 mesi): 5.4 – 48.5

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: 3.5-DiBr-PAESA

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911 kit Randox cod.9163, impiegato secondo le istruzioni del metodo in manuale

Zinco (Zn)

Funzione biologica

Lo zinco è componente strutturale e funzionale della carbossipeptidasi e partecipa direttamente all'azione catalitica di tale enzima. Tale microelemento promuove l'attività delle cellule Helper indispensabili per i processi di risposta immunitaria umorale.

Lo zinco è presente nell'insulina ed è necessario al mantenimento delle normali concentrazioni ematiche di vitamina A. I tessuti che contengono più zinco sono i peli, i tessuti pigmentati dell'occhio, le ossa ed i testicoli in piena attività sessuale.

Interpretazione

La determinazione dei livelli plasmatici di zinco assume particolare significato qualora subiscano una diminuzione. Decresce infatti a seguito di diabete, leucemia e in condizioni di stress. La diminuzione dei livelli ematici riscontrata in tali situazioni, è legata sia a un minor apporto a livello dell'organismo, conseguente alla restrizione alimentare, sia ad un aumento della sua eliminazione a livello renale.

Valori normali nel plasma bovino (mmol/l) da Ravarotto et al., 2000

Vitelloni Charolaise di 200-250 kg (3-4 mesi): 1.5 – 28.8

Vitelloni Charolaise di 600-650 kg (12-14 mesi): 7.3 – 66.3

Esecuzione dell'analisi

Campione: plasma derivato da sangue in Li-eparina

Principio del metodo: 5-Br-PAPS

Sistema analitico: analizzatore biochimico Roche BM Hitachi 911, kit manuale Randox 9165

RINGRAZIAMENTI

In questa sede riteniamo opportuno ringraziare i seguenti colleghi, che hanno contribuito a diverso titolo agli studi di campo su cui si basa in gran parte tale Quaderno:

Luigi Bertocchi, Claudia Boldetti, Riccardo Bravo, Simonetta Colombo, Matteo Frasnelli, Rosangela Garlappi, Daniela Gelmetti, Valentina Gualdi, Roberto Tadeo

Si ringrazia inoltre il personale del Laboratorio di Biochimica Clinica dell'IZSLER per la preziosa opera di assistenza tecnica.

A tutti il nostro apprezzamento e la nostra riconoscenza per la collaborazione prestata, corredata da preziosi suggerimenti ed informazioni.

Brescia, marzo 2002
Massimo Amadori, Ivonne Laura Archetti

Finito di stampare
il 31.05.2002
Presso la



Tipografia
CamunaS.P.A.

Brescia - Breno

