

INDICATORI EMATOCHIMICI NELLA VALUTAZIONE DEL BENESSERE DEL BROILER: ATTUALITA' E PROSPETTIVE

Ivonne Laura Archetti

Laboratorio Biochimica clinica – Centro di referenza Nazionale per il Benessere Animale
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Il benessere Animale è “..un termine che comprende lo “well-being” fisico e mentale dell'animale” (Brambell, 1965) . Un'altra definizione completa è quella di *Hurnik del 1988* “ Il benessere animale è uno stato o una condizione di armonia fisica e psicologica tra l'organismo e il suo ambiente caratterizzata dall'assenza di privazioni, stimoli avversi, sovrastimolazioni o qualsiasi altra condizione imposta che influenzi negativamente la salute e la produttività di un organismo”.

La definizione che meglio si addice allo studio del benessere attraverso parametri di laboratorio è la definizione di Broom e Johnson, secondo la quale il benessere animale è “Lo stato di un individuo per quanto concerne i suoi tentativi di adattarsi all'ambiente”. Il benessere diventa così la caratteristica di ogni singolo animale e in quanto tale misurabile all'interno di una scala che va da scarso a ottimo (in rapporto alle diverse condizioni ambientali) e non è dipendente da considerazioni morali. Da tale descrizione scaturisce dagli stessi autori la definizione di stress come “ Effetto ambientale di un organismo 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”. Le problematiche di benessere sono diverse per animali appartenenti a specie diverse , in funzione delle diverse condizioni di allevamento, a seconda del grado di intensificazione e industrializzazione. Tale livello è purtroppo assai elevato per le specie avicole per le quali si registra in aggiunta un elevato livello di specializzazione funzionale all'interno degli allevamenti della stessa specie. Va sottolineato che l'andamento del livello di benessere non è direttamente correlato all'andamento della produttività e quindi, nei nostri studi, è importante riuscire a trovare quel punto che rappresenti il giusto equilibrio tra qualità delle produzioni e produttività e di miglior compromesso tra costi produttivi e benessere degli animali. (D.J.Mellor e coll., 2001).

La reazione dell'animale ad uno stimolo stressogeno comporta l'attivazione di meccanismi di adattamento che variano a seconda della permanenza dello stimolo stesso, per cui esistono parametri atti alla valutazione dello stress a breve termine o a lungo termine .

Nel primo gruppo possiamo trovare le valutazioni comportamentali, la misurazione di parametri fisiologici (battito cardiaco, frequenza respiratoria, ormoni, enzimi, prodotti metabolici), la valutazione organolettica delle carni etc. . Appartengono al secondo gruppo la valutazione delle funzioni riproduttive, delle aspettative di vita, degli incrementi ponderali, del comportamento e la misurazione di parametri fisiologici (ormoni, parametri metabolici e soprattutto i parametri immunitari). I parametri ematochimici sono utili alla valutazione di entrambe le tipologie di stress ma quali sono le loro caratteristiche? Sicuramente sono misure obiettive e indipendenti da considerazioni morali ma rappresentano soltanto uno tra i diversi strumenti di una valutazione del benessere che deve essere complessiva e multidisciplinare. Devono essere inoltre validati per quella specie e categoria animale, essere ripetibili e riproducibili, risentire scarsamente delle turbative legate alla manualità di prelievo del campione, avere un potere esplicativo e poter essere utilizzati mantenendo un buon rapporto costo - beneficio. Soddisfatto ciò, rimangono in ogni modo aperti due grossi interrogativi nel loro utilizzo: quando andiamo a definirne il valore "normale" a quale tipologia di animale ci dobbiamo riferire? La misura di un parametro ci può indicare che il benessere è compromesso, ma quanto deve essere variato quel parametro per poter affermare che il benessere di quell'animale è a rischio?

E' importante a questo punto fare alcuni accenni di fisiologia dello stress per capire l'utilizzo di questo tipo di parametri. La risposta ad uno stress (fisico, sociale, microbiologico ecc.) provoca una reazione integrata che coinvolge il sistema nervoso centrale (che agisce attraverso le innervazioni), il sistema endocrino (attraverso gli ormoni) e il sistema immunitario (che agisce attraverso le citochine). Ognuno di questi sistemi influenza e agisce sull'altro creando quello che è definito il "Circuito psico-neuro-endocrino-immunologico", di cui fanno parte l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e gli organi del sistema immunitario. La risposta coordinata tra questi tre sistemi durante lo stress porta alla risposta omeostatica adattativa dell'animale. I principali effettori sono rappresentati dai glucocorticoidi che partecipano a tutti i meccanismi omeostatici attivati durante uno *stress*; questi ormoni rappresentano inoltre una molecola chiave nella regolazione neuroendocrina, in quanto esercitano un *feedback* negativo sui neuroni ipotalamici.

La particolare "plasticità" di questo sistema fa ritenere che le sue modalità funzionali siano le risultanti non solo di fattori ereditari, ampiamente dimostrati nell'uomo e negli animali, ma anche di sollecitazioni improprie per intensità, durata o reiterazione, cui può essere sottoposto. Esperienze stressanti vissute da un individuo nel periodo perinatale possono modificare in maniera profonda e permanente l'attività del sistema nell'età adulta; allo

stesso modo, *stress* di particolare violenza vissuti nell'età matura ne possono alterare profondamente l'attività.

Esistono naturalmente delle differenze biologiche tra il grado di sviluppo del sistema nervoso centrale e periferico degli avicoli e quello di altre specie animali superiori nella scala evolutiva ma la risposta allo stress è simile. Anatomicamente esistono alcune differenze: le ghiandole surrenali dei broiler, a differenza dei mammiferi, non sono chiaramente suddivise in due zone, una midollare e una corticale ma i due tessuti sono "mescolati". Inoltre, se nei mammiferi troviamo una chiara distinzione tra le funzioni dei mineralcorticoidi e dei glucocorticoidi, nei polli le stesse si sovrappongono. Il corticosterone è lo steroide maggiormente presente, in rapporto 14 a 1 con l'aldosterone. Il Corticosterone esercita il proprio influsso durante la risposta allo stress, portando ad una disregolazione della funzionalità immunitaria (immunodepressione) e infiammatoria e quindi aumentando il rischio di malattie infettive e neoplastiche. Negli uccelli le cellule immunocompetenti sono quelle derivate dal timo e dalla Borsa di Fabrizio. Alti livelli di corticosterone portano ad eterofilia (neutrofilia), linfocitopenia, alterazioni nella proporzione delle altre popolazioni leucocitarie, la funzionalità dei linfociti T risulta diminuita (diminuita proliferazione in risposta all'antigene, diminuzione del rilascio di IL-2, aumento suscettibilità alle malattie infettive soprattutto da patogeni intracellulari). I linfociti B producono meno anticorpi. I ricercatori hanno dimostrato, fin dagli anni 60, che in polli allevati in condizioni di sovraffollamento, lo stress cronico era associato ad un incremento del peso delle surrenali ed a una regressione dei tessuti linfatici (Siegel, 1960). In un altro articolo si riporta che dopo 12 ore di trattamento ad alta temperatura la risposta anticorpale verso diversi antigeni decrementa (Siegel 1972). L'effetto del corticosterone porta ad un'involuzione degli organi immunocompetenti, in esperimenti in cui l'infusione di corticosterone mima gli stress ambientali, il peso del timo decrementa fino al 75%, della milza del 35% e della Borsa di Fabrizio fino al 57% (Donker et al. 1989).

Trattamenti sottocutanei con corticosterone portano inoltre ad una depressione dose-dipendente del titolo anticorpale verso i globuli rossi di pecora (Davison 1987). Interessante è anche lo studio di Trout del 1988 che ipotizza che siano gli stessi leucociti a secernere ACTH, essendo stato dimostrato che l'inoculazione di polli con SRBC ne incrementa la presenza (Siegel 1985). Questo potrebbe costituire un meccanismo di feedback per controllare la risposta immune.

Molteplici e noti sono gli effetti del corticosterone sul metabolismo: stimola la gluconeogenesi epatica, aumenta la produzione di insulina, agisce sul metabolismo

proteico (funzione anti-anabolica), facilita il metabolismo dei grassi, stimola il catabolismo della massa muscolare, agisce sul metabolismo calcico e idro-salino etc. Ecco che in condizioni di stress possiamo trovare nel plasma un aumento di glucosio, un aumento dei NEFA, del colesterolo, della Creatin chinasi, della latticodeidrogenasi e alterazioni di altri parametri metabolici. Un quadro veramente completo della variazione dei parametri fisiologici ematochimici nel pollo in seguito ad uno stimolo stressogeno è fornito dai lavori di Puvadolpirod et al. "Model Of Physiological Stress In Chickens", pubblicato su Poultry science nel 2000 e diviso in quattro parti. Puvadolpirod simula lo stress inoculando in modo continuo, mediante una piccola pompa osmotica inserita chirurgicamente, ACTH a broiler di 6 settimane, a dosaggio controllato. Molto interessante è la parte in cui studia la tempistica di comparsa delle alterazioni per rispondere alla domanda se certe risposte allo stress possono mascherare o interferire con altre. In questa terza parte del lavoro Puvadolpirod arriva a stabilire un ordine di risposta, indicando il momento nel quale la differenza in termini quantitativi tra gli animali di controllo e gli animali trattati era massima. Il corticosterone era al maggior livello dopo 2 ore dall'inizio del trattamento, il glucosio dopo 12 ore, l'incremento del peso del fegato era concomitante con l'incremento dei lipidi epatici dopo 18 ore, il peso relativo della milza era decrementato dopo 24 ore, il rapporto H/L dopo 2 giorni il peso corporeo e quello relativo della Borsa di Fabrizio e del timo erano minimi dopo 4 giorni.

Grazie all'uso dei parametri ematochimici è stato possibile approfondire anche lo studio dell'"habituazione". Si era notato che gli stressor di tipo fisico sembravano essere incapaci di attivare l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene in assenza di uno stimolo di tipo emozionale (fallimento delle aspettative). Si è visto che nei polli la privazione del cibo porta ad un aumento del livello di corticosterone plasmatico, tuttavia la risposta è più grande se in precedenza gli animali erano stati alimentati *ad libitum* (Rees et al. 1984), così come l'esposizione neonatale a stress termici sembra aumentare la tolleranza al calore nella vita futura (Arjona et al. 1988).

Eseguendo una veloce ricerca attraverso la banca dati internazionale PUBMED si evidenzia come sia in continua crescita l'interesse dei ricercatori nello studio del benessere del broiler. Utilizzando come criteri di ricerca i vocaboli "broiler and stress" presenti nel titolo o nell'abstract, si va dalle 18 pubblicazioni nel 1980-1985 alle 76 pubblicazioni del 2001-2005. Altrettanto anche se in minor misura sono cresciute le pubblicazioni con le chiavi di ricerca "Welfare and broiler". Prendendo esclusivamente le pubblicazioni dal 1996 ad oggi, si constata che il 56% delle stesse utilizzano anche

parametri di tipo emato-chimico per valutare l'effetto di diversi stressor sul benessere animale (nei broiler è soprattutto lo stress da calore ad essere maggiormente studiato) . I parametri più utilizzati sono il corticosterone, il glucosio e il rapporto tra il numero di eterofili e il numero di linfociti presenti nel sangue . Seguono gli acidi grassi non esterificati, i trigliceridi, gli enzimi muscolari e epatici, i parametri che valutano la risposta immunitaria sia cellulare che anticorpale, i parametri legati allo stress ossidativo, altri ormoni collegati allo stress come l'insulina o gli ormoni tiroidei ed altri ancora.

Addentrando ora maggiormente nella realtà del laboratorio, va ricordato che, perchè l'indagine abbia un significato, deve essere svolta in maniera affidabile in tutte le sue fasi a partire dall'appropriata scelta dell'animale, dall'esatta esecuzione del prelievo, dalla conservazione idonea del campione, passando attraverso l'iter analitico vero e proprio, per giungere alla stesura del referto e al suo adeguato impiego. Sappiamo, infatti, che esiste una fase pre-analitica (valutazione dello stato dell'animale, tipo di prelievo, trasporto e conservazione del campione) che può pregiudicare, se non controllata e definita , sia la fase analitica che post-analitica .

Il Centro di Referenza Nazionale del Benessere Animale, dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna si è di solito occupato di studi sullo stress cronico per questo ha scelto come parametri di indagine quelli legati alla valutazione della risposta immunitaria. Il loro utilizzo vanta numerosi vantaggi: non richiedono tempi prolungati di osservazione dell'animale né l'impiego prolungato in azienda di personale specializzato, risentono scarsamente delle turbative legate alla manualità di prelievo del campione, forniscono dati predittivi sulla possibile evoluzione di condizioni di scarso benessere verso patologie clinicamente conclamate. Oggi però abbiamo cercato di ampliare il pannello d'indagini a nostra disposizione per questo siamo in grado di dosare parametri biochimici, all'interno di diversi profili d'organo, sia parametri endocrini, sia parametri legati allo stress ossidativo. Il campione è rappresentato principalmente da sangue prelevato dalla vena brachiale del pollo mediante siringa e raccolto in provetta contenente Litio Eparina. Il campione è immediatamente refrigerato per il trasporto che deve essere il più breve possibile. Su tale campione, prima della separazione del plasma, può essere eseguito l'esame emocromocitometrico. Purtroppo il campione aviario presenta problemi pre-analitici superiori a quello di altre specie: è difficile il prelievo di più provette con anticoagulanti diversi, è spesso insufficiente e il plasma si presenta viscoso. Ricordiamo inoltre che il prelievo, per gli animali di piccola taglia, costituisce un test molto invasivo, che può portare, se non eseguito in tempi rapidi, ad un aumento degli ormoni

dello stress. Per altre specie animali sono stati validati dosaggi ormonali su campioni di saliva, feci e pelo al fine di ovviare a quest'inconveniente. Per quanto riguarda le specie aviari alcuni lavori riportano il dosaggio di corticosterone nell'albume delle uova. Sia nello studio dello stress da calore, sia dello stress sociale legato alla densità, negli animali riproduttori, sembra che tale tipo di campione fornisca ottimi risultati. Nell'albume il corticosterone viene accumulato durante tutte le sei ore necessarie alla formazione dell'uovo, questo può aumentare i livelli dello stesso in modo da ovviare al problema della quantità insufficiente, specialmente se operiamo in un singolo punto di osservazione. (J.A. Dowing et coll. 2002).

Terminiamo con l'indicazione di interpretare i parametri ematochimici sempre valutando la cinetica temporale e la prevalenza delle loro alterazioni, la concomitanza e l'associazione delle stesse a parametri di significato prognostico negativo per l'animale.

I parametri ematochimici aiutano a valutare l'adattamento dell'animale all'ambiente che lo circonda, ad identificare i punti critici dell'allevamento e in correlazione alla valutazione di altri indici di benessere animale, possono fornire indicazioni utili per la pianificazione di idonee strategie manageriali.

Bibliografia disponibile presso il Laboratorio