

**UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE
PIACENZA**

**Scuola di Dottorato per il Sistema Agro-alimentare
ciclo XXII
S.S.D: AGR/19**

**RICERCHE SU TALUNI INDICATORI DI TIPO BIOCHIMICO-
FISIOLOGICO ATTI A VALIDARE I MODELLI DI VALUTAZIONE
DEL BENESSERE NEGLI ALLEVAMENTI DI BOVINE DA LATTE.**

Tesi di Dottorato di: Sara Carè

Matricola: 3580169

Anno Accademico 2008/2009



**UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE
PIACENZA**

**Scuola di Dottorato per il Sistema Agro-alimentare
ciclo XXII
S.S.D: AGR/19**

**RICERCHE SU TALUNI INDICATORI DI TIPO BIOCHIMICO-
FISIOLOGICO ATTI A VALIDARE I MODELLI DI VALUTAZIONE
DEL BENESSERE NEGLI ALLEVAMENTI DI BOVINE DA LATTE.**

Tesi di Dottorato di: Sara Carè

Matricola: 3580169

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Gianfranco PIVA

Tutor: Chiar.mo Prof. Luigi Calamari

Anno Accademico 2008/2009

*La grandezza e il progresso morale di una nazione
si possono giudicare dal modo
in cui vengono trattati gli animali.*

Mahatma Gandhi

INDICE

INTRODUZIONE	pag.3
CAPITOLO 1 DEFINIZIONE DI BENESSERE ANIMALE	pag.6
CAPITOLO 2 STRESS E BENESSERE	pag. 15
2.1 Definizione del concetto di stress	pag. 15
2.2 Stress acuto e cronico	pag. 18
2.3 Risposta dell'individuo alle condizioni di stress acuto e cronico	pag. 19
2.4 Stress da malattia	pag. 24
CAPITOLO 3 INDICATORI PER LA VALUTAZIONE DEL BENESSERE ANIMALE	pag. 27
3.1 Indicatori Indiretti	pag. 30
3.2 Indicatori Diretti	pag. 32
3.3 Performance e indicatori dello stato sanitario degli animali	pag. 34
3.4 Indicatori Fisiologici per la valutazione dello stress acuto e cronico	pag. 37
3.5 Markers dello stress cronico	pag.45
CAPITOLO 4 MODELLI DI VALUTAZIONE DEL BENESSERE	pag. 46
4.1 La scelta degli indicatori	pag. 48
4.2 Sviluppo dei modelli di valutazione del benessere	pag. 51
4.3 Aggregazione degli indicatori utilizzabili nei modelli di valutazione del benessere	pag. 52
4.4 Esempi di modelli di valutazione del benessere in campo presenti in Europa	pag. 53
4.5 Il modello SDIB (Sistema Diagnostico Integrato Benessere)	pag. 58
4.6 Modelli di validazione utilizzati per la valutazione del benessere animale nell'ambito della ricerca scientifica	pag. 66
CAPITOLO 5 INDICATORI FISIOLOGICI UTILIZZABILI PER LA VALIDAZIONE	pag. 68
5.1 Il cortisolo	pag. 68
5.2 La fruttosamina	pag. 72
CAPITOLO 6 SCOPO GENERALE DELLA RICERCA	pag. 77
CAPITOLO 7 PRIMA PROVA SPERIMENTALE	pag. 78
7.1 Scopo della prova	pag. 79
7.2 Materiali e metodi	pag. 80
7.3 Analisi statistica	pag. 83
7.4 Risultati	pag. 85
7.5 Discussione	pag. 106
7.6 Considerazioni conclusive	pag. 112

CAPITOLO 8 SECONDA PROVA SPERIMENTALE	pag. 113
8.1 Scopo della prova	pag. 114
8.2 Materiali e metodi	pag. 115
8.3 Analisi statistica	pag. 118
8.4 Risultati	pag. 120
8.5 Discussione	pag. 134
8.6 Considerazioni conclusive	pag. 136
CAPITOLO 9 TERZA PROVA SPERIMENTALE	pag. 137
9.1 Scopo della prova	pag. 138
9.2 Materiali e metodi	pag. 139
9.3 Analisi statistica	pag. 140
9.4 Risultati	pag. 144
9.5 Discussione	pag. 166
9.6 Considerazioni conclusive	pag. 175
CAPITOLO 10 CONCLUSIONI GENERALI	pag. 177
APPENDICE	pag. 181
Metodiche analitiche	pag. 181
Analisi degli alimenti	pag. 181
Analisi del latte	pag. 183
Analisi chimica del sangue	pag. 183
Schede utilizzate nel modello SDIB	pag. 194
ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI	pag. 198
BIBLIOGRAFIA	pag. 200
RINGRAZIAMENTI	pag. 231

INTRODUZIONE

“Che cosa si intende per “questione del benessere animale”? Quando si presenta all’attenzione della comunità scientifica e dell’opinione pubblica? La questione del benessere animale si pone all’attenzione della comunità scientifica e dell’opinione pubblica in modo graduale e variabile. Un primo approccio alla problematica risale al 1964, quando Ruth Harrison pubblicò, in Inghilterra, *Animal Machines*, un libro dedicato all’esame delle condizioni di vita degli animali d’allevamento. L’impatto sull’opinione pubblica fu notevole, al punto da spingere il governo inglese a istituire un’apposita commissione di indagine sul tema posto all’attenzione. Dall’indagine di questa commissione, scaturì un documento, divenuto noto con il nome di *Rapporto Brambell* e pubblicato nel 1965, in cui, per la prima volta, di fronte alle numerose problematiche evidenziate riguardo alle condizioni di vita, al malessere e alla sofferenza degli animali allevati, si gettavano le basi per una definizione del benessere animale e per una sua considerazione in termini scientifici. Bentham (1789) concentrando l’attenzione sulla capacità di soffrire degli animali, aveva ben circoscritto i termini della questione; nessuna meraviglia quindi se il benessere costituisca oggi uno dei temi di maggiore interesse per la riflessione bioetica in campo animale. Intorno a tale questione si catalizza il confronto tra i movimenti animalisti e i sostenitori dei vari interessi scientifici ed economici connessi agli animali. Tant’è vero che le normative a tutela degli animali che vengono di volta in volta approvate, sia a livello comunitario sia a livello nazionale, sono spesso il frutto di aggiustamenti e compromessi tra queste due opposte istanze. Inoltre è da rilevare che il fiorire della letteratura sul benessere animale (di cui si è testimoni soprattutto negli ultimi quindici anni) è il segno inequivocabile di un aumento della sensibilità e della consapevolezza nei confronti degli animali e del trattamento loro riservato. Spesso, infatti, sofferenza e maltrattamenti sono frutto non solo di incuria, ma anche di ignoranza e di errata comprensione delle esigenze degli animali. La riflessione sul benessere animale, pertanto, si propone anzitutto di promuovere l’assunzione di un’ottica allargata (in cui rientri anche quella dell’animale) che scaturisca da un dialogo e da un confronto tra le parti, e inoltre di orientare razionalmente l’aumentata sensibilità verso un approfondimento delle conoscenze sul tema del benessere. Il tutto al fine di ridurre quanto più possibile la sofferenza animale e di migliorarne le condizioni di vita.

Le parti coinvolte nel dialogo e nel confronto, pertanto, non sono rappresentate solo da coloro i quali, riflettendo nell’alveo del pensiero animalista, hanno elaborato le diverse teorie sul rapporto con gli animali cui si è accennato, ma anche da chi è impegnato sul piano pratico nell’impiego dell’animale: i produttori, gli allevatori, gli zootecnici, le ditte farmaceutiche, i medici veterinari (impegnati nella sanità pubblica o negli ambulatori privati). Oppure da chi è impegnato sul piano giuridico e legislativo ad elaborare e far rispettare norme di tutela nell’impiego animale, da chi

lavora nei comitati etici di valutazione dei protocolli di sperimentazione o simili; infine da chi rappresenta l'utente finale, cioè il consumatore.

Il dialogo tra le parti che sia i comitati etici che l'opinione pubblica, si propongono di promuovere è quindi articolato a partire da una piattaforma minima di condivisione - il richiamo alle regole più elementari di civiltà e al senso di rispetto per qualsivoglia essere vivente - per poi concentrarsi sulle diverse problematiche che emergono nel rapporto dell'uomo con gli animali, a prescindere dalle posizioni e dai punti di vista specifici.

Il primo passo da compiere è pertanto quello di porsi un quesito relativo al significato dell'espressione "*benessere animale*", sia dal punto di vista scientifico e sia dal punto di vista bioetico. Innanzitutto è da osservare che la letteratura sul tema del benessere animale è molto vasta ed articolata, o in concreto, riflettere sul benessere dell'*animale selvatico* (magari utilizzato per la caccia oppure per spettacoli e intrattenimento) è cosa molto diversa dal riflettere sul benessere dell'*animale domestico* (animale che è stato sottoposto ad un lungo processo di domesticazione da parte dell'uomo e che ora dipende da questi per la propria sopravvivenza e per la propria riproduzione.)

Data la complessità dell'approccio a tale problematica, è stato necessario operare una scelta riguardo ai temi oggetto di approfondimento e si è preferito puntare l'attenzione sulla questione del benessere relativo agli animali domestici che, a vario titolo (animali da reddito, da compagnia, da sperimentazione, ecc.), sono coinvolti nelle pratiche di gestione da parte dell'uomo. Come risulterà chiaro da ciò che segue, un corretto approccio al tema del benessere per l'animale domestico deve svilupparsi prendendo in considerazione non solamente l'assenza di malessere, ma anche il rispetto e la promozione delle condizioni di vita capaci di assicurare un certo benessere. Se dunque si vogliono tracciare le coordinate che definiscono la questione del benessere, è necessario procedere esaminando criticamente le varie definizioni offerte dalla letteratura scientifica, per mettere a fuoco quali sono gli elementi in gioco.

Successivamente si potrà poi procedere alla sua valutazione; partendo dal presupposto che le conoscenze scientifiche su fisiologia e stato di salute degli animali, così come l'interpretazione del comportamento animale e la consapevolezza delle modalità con cui l'ambiente e il management influiscono sugli animali rappresentano elementi basilari per l'obiettivo che ci si è proposto. Conseguentemente la valutazione del benessere è spesso un'analisi multifattoriale che include indicatori dello stato fisiologico e di salute, osservazioni sul comportamento degli animali, descrizione degli ambienti di allevamento e informazioni sulle operazioni di routine e management. La diversa sensibilità ai vari aspetti ha portato negli ultimi vent'anni alla messa a punto di diversi sistemi di valutazione del benessere degli animali in produzione zootecnica. Questi metodi variano

a seconda dello scopo per cui vengono adottati (certificazione del livello di benessere di una singola azienda, confronto tra diversi sistemi di produzione, assistenza tecnica ai singoli allevatori, ricerca scientifica). Essi tuttavia concordano sull'impiego congiunto di parametri delle condizioni di vita e rilievi sugli animali, al fine di ottenere una valutazione per quanto possibile oggettiva del benessere animale.

Nella prospettiva della bioetica animale tutto questo significa conferire valore al rispetto per l'alterità animale e assumere un punto di vista responsabile nei confronti di esseri che siano essi animali da reddito, da sperimentazione o da compagnia, o che siano comunque soggetti viventi e non meri oggetti d'uso.

1. DEFINIZIONE DI BENESSERE ANIMALE

Il benessere animale è una questione dalle molteplici sfaccettature che implica importanti dimensioni scientifiche, etiche, economiche e politiche (Lund et al., 2006). Di conseguenza, questa scienza necessita di un approccio interdisciplinare, unendo i ricercatori di differenti discipline all'interno delle scienze biologiche, come la fisiologia, le scienze veterinarie, l'etologia e la psicologia comparata. Inoltre, sebbene il primo passo si fosse basato sulle scienze biologiche, successivamente è apparso necessario utilizzare un approccio multidisciplinare nei confronti della questione scientifica del benessere animale. Infatti, questo approccio, combinando principalmente l'etologia, la fisiologia, la psicologia e gli studi sull'interazione uomo-animale, può offrire i vantaggi di aumentare la comprensione di conoscenze sulle problematiche relative al benessere animale nonché di ottenere miglioramenti metodologici.

Per quanto concerne l'etologia, è noto che questa disciplina ha un ruolo chiave sia nello sviluppo della scienza del benessere animale (Millman et al., 2004) che nella ricerca applicata. Gli studiosi di etologia applicata devono utilizzare un approccio "dell'animale intero", che include lo studio del nesso di causalità e lo sviluppo di sistemi comportamentali, che sono legati alla comprensione dello stress animale, che a sua volta lega il comportamento e le sue condizioni fisiologiche (Broom and Johnson, 1993; Moberg and Mench, 2000).

L'applicazione pratica dei risultati della ricerca sull'etologia applicata può contribuire a migliorare la progettazione degli edifici, delle strutture e del management (Grandin, 1993) che consente agli animali di esprimere il loro comportamento e di adattarsi all'ambiente.

I concetti e gli approcci derivanti dalla psicologia cognitiva sono stati anche applicati nella ricerca sul benessere animale, per esempio per sviluppare teorie e metodi di ricerca riguardanti le emozioni degli animali da reddito (Désiré et al., 2002). Analoghi studi sulla domanda dei consumatori, una metodologia usata per la prima volta negli studi di micro – economia, sono stati utilizzati al fine di scoprire che valore hanno per gli animali le risorse ambientali (Cooper, 2004). Tuttavia la collaborazione tra gli etologi, fisiologi e psicologi ha prodotto un modello per interpretare le interazioni tra l'animale e il personale di stalla (Hemsworth and Coleman, 1998).

La natura e le conseguenze di tali interazioni sia per l'uomo che per l'animale possono spiegare da un lato gli effetti di alcuni stressori sui processi riproduttivi, sul metabolismo e sulla risposta immunitaria; dall'altro la qualità della gestione degli animali che coinvolge sia il benessere che la produttività animale.

Poiché lo studio del benessere animale coinvolge sia l'allevamento che le interazioni tra l'uomo e l'animale, l'approccio multidisciplinare deve includere una "collaborazione" tra le scienze biologiche e quelle sociali; questo può incrementare le conoscenze su rilevanti aspetti del

comportamento animale e del ruolo che gli animali occupano nella società. Da questo punto di vista anche la collaborazione con i filosofi ha mostrato di essere fruttuosa sia per riconoscere l'importanza della scienza che si occupa dello studio del benessere animale e sia per comprendere in modo completo il concetto di benessere animale (Lund et al., 2006).

Nel corso della storia si sono sviluppate numerose definizioni relative al concetto di benessere animale. Come “disciplina formale” cominciò con la pubblicazione del rapporto *Brambell* sul benessere animale degli animali da allevamento, diffuso dal governo Britannico nel 1965 (Brambell Report, 1965). L'adozione di un approccio scientifico convenzionale, con esperimenti focalizzati sugli effetti di singoli fattori in circostanze controllate (Sandøe et al., 2003), consentì a questa nuova “disciplina” di essere costituita come scienza o come “giovane scienza” (Millman et al., 2004).

Più recentemente un grande numero di ricerche sono state effettuate sulle problematiche relative al benessere animale, coinvolgendo settori di interesse molto specifici tra cui lo sviluppo di modelli di valutazione di benessere in differenti ambienti, come pure molte questioni fondamentali relative alle basi biologiche dello stress e del benessere.

Tra le principali problematiche in gioco, oltre a quella del benessere, sono i concetti di “sofferenza” e “bisogno”, come pure le “cinque libertà” che sono strettamente correlate con l'allevamento animale e il management da parte dell'uomo. Questi concetti sono collegati al fatto che gli animali sono ora riconosciuti come “esseri senzienti” come nel Trattato di Amsterdam del 1997 che conferisce una speciale considerazione per loro a livello di legge Europea (Millmann et al., 2004).

Al concetto di “senziente” è stata già data una validità scientifica da Darwin citato da Webster, (2006), ed è collegato al forte dibattito che aveva opposto in passato etologi e comportamentalisti; infatti in principio la American School of Behaviourism non accettava nel vocabolario scientifico “tutti i termini soggettivi come sensazione, percezione, immagine, desiderio e persino il pensiero e le emozioni”. (Watson, 1928; Skinner, 1938). Inizialmente gli etologi hanno anche generalmente ristretto le loro considerazioni sul comportamento osservabile, sebbene vengano usati termini come “affamato”, “dolore”, “paura” e “frustrazione” (Duncan, 2006). Da alcuni scienziati (Tinbergen, 1951) sono state adottate anche le seguenti posizioni: “Poiché i fenomeni soggettivi non possono essere osservati oggettivamente sugli animali, è inutile reclamare o negare la loro esistenza.” La sensibilità degli animali è diventata una questione importante dopo la pubblicazione di del libro di Griffin su tale argomento (Griffin, 1976). A causa dello sviluppo della ricerca e dei cambiamenti delle posizioni iniziali, psicologi e etologi hanno cominciato a collaborare.

Pertanto, in contrasto con la convinzione che noi uomini non potremo mai conoscere come si sentono gli animali, ma solo come si comportano, alcuni etologi, tra cui Dawkins (1980,1993) ed alcuni psicologi tra cui Toates (1986), ha condotto studi sulla percezione, sul processo decisionale,

sulla consapevolezza di sé, o sulla capacità di imparare da altri al fine di capire la mente degli animali. Questi studi oltre a rendere possibile l'ottenimento di una più profonda conoscenza della mente degli animali, danno anche una chiara fotografia di come l'animale percepisce il mondo e come gli stimoli derivanti dall'ambiente esterno possono incidere sul loro livello di benessere. Certamente, la percezione degli stimoli e la conseguente reazione a questi sono determinati dall'interazione tra il genotipo (specie e razza) e l'apprendimento (esperienza e interpretazione di questa esperienza) (Webster, 1994). La possibilità di approfondire la conoscenza del "mente" degli animali rende anche possibile capire in maniera migliore sia le esperienze positive che quelle negative degli animali (Duncan, 2002), queste ultime possono anche comprendere la "sofferenza", che consiste in una "vasta gamma di stati spiacevoli" (Duncan and Dawkins, 1983). La sofferenza sopraggiunge "quando sgradevoli sensazioni soggettive sono acute o persistono per un lungo periodo, poiché un animale non è in grado di compiere le azioni che possono normalmente ridurre i rischi per la vita e la riproduzione in tali circostanze" (Dawkins, 1990)

I differenti aspetti del concetto di benessere animale vengono sempre più spesso presi in considerazione negli studi relativi alle scienze animali: questo implica che tutte le componenti biologiche (sia quelle fisiologiche che quelle psicologiche), concorrono nel determinare il livello di benessere e quindi devono essere legate e studiate parallelamente.

Vari sono i meccanismi biologici volti al simultaneo adattamento a molti stimoli ambientali, a volte conflittuali e potenzialmente stressanti, la cui importanza determina nell'animale la priorità di risposta. La "sfida" per la ricerca relativa al benessere animale è di scoprire cosa l'animale "sente" e quanto questo sia importante per esso.

Successivamente, secondo quanto riportato da Carenzi e Verga (2009) un'altra importante questione da risolvere è quella di trovare quali siano i bisogni specifici di un animale e come questi possano essere soddisfatti dall'ambiente in cui vivono; infatti la possibilità di soddisfare i bisogni biologici è correlata al livello di benessere animale ed anche con le scelte (volontarie o meno) attuate nel processo di domesticazione e successiva selezione.

I bisogni variano in accordo con le caratteristiche della specie e con l'evoluzione, e possono essere divisi in differenti categorie, che vengono di seguito enunciate:

- bisogni ambientali, come gli edifici e il management che includono l'allevamento e la gestione, come pure le condizioni igieniche, il trasporto e l'arricchimento ambientale;
- bisogni fisiologici e comportamentali: che includono la possibilità di esprimere le principali funzioni biologiche, come pure il repertorio comportamentale. Questa

possibilità può anche dipendere dalla relazione che si instaura con l'uomo e dalla selezione genetica di soggetti allevati per caratteristiche desiderabili.

I sistemi funzionali biologici e lo stato motivazionale di ciascun animale determinano la presenza di una varietà di bisogni che devono essere soddisfatti più o meno velocemente in base alle esigenze che sono ognuno di essi presenta (Baxter,1988; Broom,1988; Hughes and Duncan,1988), e l'impossibilità di soddisfare tali bisogni può provocare problemi di benessere.

In alcuni casi è possibile conoscere i bisogni degli animali, per mantenere un approccio scientifico nella ricerca, studiando i legami tra questi bisogni biologici e le conseguenze per l'organismo, che soddisfano o meno tali bisogni. In questa considerazione, è comunque necessario mantenere un punto di vista critico circa il significato dei bisogni biologici evitando un'interpretazione antropomorfizzata (Morton et al., 1990).

A questo riguardo (soddisfacimento dei bisogni), nell'allevamento animale è stato introdotto il concetto di "libertà" ed ha giocato un ruolo chiave nell'ambito delle problematiche relative al benessere animale. Infatti la conoscenza relativa ai bisogni degli animali è correlata alla proposta di dare agli animali alcune "libertà" (Brambell Report, 1965), revisionate poi dal FAWC (1993) come segue:

- Libertà dalla sete, dalla fame e dalla malnutrizione: consentendo all'animale sia il libero accesso all'acqua e garantendo che una dieta adatta a mantenere completa salute e vigore;
- Libertà dal discomfort: fornendo all'animale un ambiente adeguato che includa riparo e una confortevole area di riposo;
- Libertà dal dolore, dalle ferite e dalle malattie: grazie alla prevenzione, diagnosi rapida e fornendo all'animale gli adeguati trattamenti medici necessari per garantire la buona salute dello stesso;
- Libertà di espressione dei normali comportamenti: garantendo all'animale un adeguato spazio, mezzi adeguati e compagnia di altri animali appartenenti alla stessa specie.;
- Libertà dalla paura e dal distress: garantendo le condizioni che evitano la sofferenza mentale dell'animale.

In accordo con quanto pubblicato da Webster (1994), l'assoluto conseguimento di tutte le 5 libertà è irrealistico, ma queste libertà sono un "tentativo per rendere al meglio una complessa e difficile situazione". Queste dovrebbero essere profondamente considerate in un sistema di allevamento zootecnico, poiché rispettandole, si potrebbe fornire agli animali la possibilità di adattarsi meglio ad esso al fine di evitare l'insorgenza di inutili sofferenze e conseguentemente produrre di più in

ottime condizioni. In ogni caso, il benessere animale deve essere considerato sia in maniera realistica, evitando antropomorfizzazioni nella sua valutazione (Webster, 1994) che in modo meccanicistico.

Il lungo dibattito riguardo al benessere animale include la possibilità di definire il termine “benessere” nella sua complessità. Questa parola deve riflettere un chiaro concetto che può essere scientificamente valutato (EFSA,2006), che può essere utilizzato nella comunità scientifica e può essere incluso nella normativa (Broom, 1991). La definizione può anche spiegare il significato del benessere animale per varie categorie di persone, come corporazioni, consumatori, veterinari, politici e altri (Hewson, 2003).

Alla luce di tutte le considerazioni fatte in precedenza, il termine “benessere” non è stato uniformemente definito e utilizzato nella letteratura. Questo può essere dovuto alle differenti attitudini verso gli animali e alle differenti metodologie utilizzate per la sua valutazione (Weber and Zarate, 2005).

Così numerose definizioni di benessere sono state proposte in accordo con gli sviluppi culturali dell’opinione della società circa la relazione tra l’uomo e gli animali. Nel passato, il benessere è stato considerato dai veterinari e dagli allevatori principalmente in termini di condizione fisico-corporea, ma questo punto di vista presenta numerose limitazioni: per esempio buoni risultati fisici dovuti alla genetica e all’ambiente, non presuppongono che lo stato mentale sia sempre ottimale. Tuttavia, lo stato fisico può essere influenzato sia da esperienze positive che da quelle negative (Hewson, 2003). Così le definizioni di benessere animale proposte da vari ricercatori riflettono i loro differenti “*background*”.

Fino ad oggi, il contributo di differenti discipline alla definizione di benessere animale sottolinea sia il funzionamento biologico che la relazione tra il corpo e la mente, considerando l’organismo in una maniera globale.

Tre principali approcci su base scientifica sono stati elaborati al fine di definire e conseguentemente trovare le metodologie per valutare il livello di benessere animale. Il primo approccio enfatizza la funzionalità biologica dell’organismo, come l’aumento di peso e la riproduzione, come pure la salute e il comportamento. Il comportamento rappresenta la prima risposta agli stimoli derivanti dall’ambiente esterno e può dare una prima e chiara fotografia del successo della capacità di adattamento dell’organismo verso gli agenti stressori. Sulla base di questa logica, un buon livello di benessere significa l’assenza di distress o una risposta vincente dell’organismo alla condizione di stress (Broom,1986; Wiepkema, 1987; Broom and Johnson,1993). Esempi di questo approccio sono le definizioni della capacità di adattamento in condizioni di stress. Broom (1986) afferma che “il benessere di un animale è la sua condizione in relazione ai suoi tentativi di adattarsi all’ambiente”.

Un secondo approccio afferma che la relazione tra il benessere e lo stress, che è il problema centrale e che è stata già illustrata da Wood-Gush et al. (1975), è un complesso di condizioni e il benessere non può essere definito semplicemente in termini di stress (Duncan, 2002). Già il Brambell Report (1965) aveva riconosciuto il ruolo dei processi mentali nel benessere. La sua definizione è stata: “il benessere è un termine ampio che abbraccia entrambi sia lo stato fisico che quello mentale di ogni animale. Qualsiasi tentativo di valutare il benessere degli animali, quindi, deve tener conto dei dati scientifici disponibili riguardanti i sentimenti degli animali che possono essere desunti dal loro corpo, dalla loro funzionalità biologica e anche dal loro comportamento.” Un'altra definizione afferma che il benessere è uno stato di completa salute fisica e mentale, in cui l'animale è in completa armonia con il suo ambiente” (Hughes, 1976). Questa definizione è molto simile a quella data dal WHO (1946): “uno stato di completo benessere fisico, mentale e sociale, e non semplicemente l'assenza di malattie o infermità”, ma riferita all'essere umano.

Così questo secondo approccio enfatizza molto l'aspetto psicologico del benessere, considerando le sensazioni e le emozioni come elementi chiave nella determinazione della qualità della vita, che include non solo lo stato del corpo dell'animale ma anche le sue sensazioni. Questo approccio è stato evocato da una sorta di criticismo all'approccio funzionale.

Più recentemente, l'approccio funzionale è molto più vicino a quello dei feelings (Broom, 1998) poiché entrambi focalizzano l'importanza sulla considerazione delle funzioni biologiche dell'organismo secondo un approccio globale.

Il terzo approccio enfatizza il modo di vita naturale, precisando che all'animale si dovrebbe consentire di vivere in accordo con le sue attitudini naturali e comportamentali principalmente sviluppando e utilizzando i suoi naturali processi di adattamento. Questo approccio può essere molto affascinante e vicino all'ambiente naturale dove l'animale ha sviluppato i processi di evoluzione naturale. Molti consumatori e politici tendono ad identificare il benessere animale con la possibilità di vita in ambiente naturale.

Per contro, gli animali domestici differiscono per molti versi dai loro conspecifici in natura e questo è dovuto al processo di domesticazione che hanno subito (Price, 1984). Può quindi essere molto difficile evidenziare le implicazioni in termini di benessere del non vivere secondo propensioni naturali in animali che comunque differiscono dai loro progenitori selvatici.

Un altro approccio alla problematica relativa alla definizione del benessere animale è stato quello proposto da Dockès and Kling-Eveillard (2006), i quali hanno evidenziato il fatto che il benessere animale dovrebbe essere considerato in base a quattro temi fondamentali:

- definizioni biologiche e tecniche, che sottolineano i bisogni fondamentali degli animali, la libertà che dovrebbe essere data a loro, nonché la possibilità di un animale di adattarsi alle modificazioni ambientali;
- proposte di regolamentazione, che riconoscono l'animale come essere senziente e come tale deve essere messo in condizioni "compatibili con le esigenze biologiche della specie";
- approcci filosofici, che considerano lo "status dell'animale" e il suo ruolo nella società;
- la comunicazione tra l'uomo e l'animale che conferisce molta importanza all'interazione tra l'allevatore e l'animale e i suoi effetti sull'allevamento.

I quattro temi precedentemente illustrati possono rappresentare il completo significato di benessere animale e le sue implicazioni nell'allevamento animale; poichè includono nella definizione del benessere animale i seguenti punti chiave: corpo, la presenza di bisogni relativi a ciò che l'animale sente, il riconoscimento dell'animale come membro della società, il rapporto che si instaura tra l'uomo e l'animale e gli effetti che tutti questi fattori possono avere su un sistema legislativo.

Benchè "la valutazione del benessere animale possa essere condotta in maniera scientifica senza il coinvolgimento delle considerazioni morali" (Fraser and Broom, 1997), il completo concetto di benessere animale e la sua valutazione può comprendere valori, giudizi e decisioni etiche su come gli animali dovrebbero essere trattati. Per questa ragione, l'approccio scientifico a tale problematica può essere connesso, anche se non necessariamente, al punto di vista etico determinando quindi un aumento delle convergenze tra scienza e filosofia.

Infatti, gli studiosi di etica cominciano a guardare alla ricerca empirica per risolvere le problematiche di natura etica, mentre gli scienziati che si occupano di studiare il benessere animale solo da un punto di vista oggettivo (Fraser, 1999) cominciano a riconoscere l'importanza delle esperienze soggettive (Lund et al., 2006). Una conferma della necessità di studiare in maniera più approfondita i legami tra il benessere animale e l'etica è stata suggerita da Fraser (1999); egli infatti ha sottolineato il bisogno di una collaborazione tra scienziati e filosofi, integrando le due culture che solo insieme possono contribuire ad aumentare la spiegazione dell'interazione tra uomo e animale.

Dal punto di vista etico, alcune questioni devono essere identificate, tra cui: "qual è lo standard di base per un benessere animale moralmente accettabile?" "Qual è un buon livello di vita per l'animale?" "Quali scopi per l'allevamento sono legittimati?" "Quali compromessi sono accettabili in un mondo quasi perfetto?" (Sandøe et al., 2003). La possibilità di rispondere a queste difficili domande può contare anche sulla scienza, che consente di capire le basi e il significato del

benessere animale applicato. Gli approcci alla conoscenza possono rendere possibile l'aumento della qualità di vita dell'animale nella prospettiva di includere sia l'uomo che tutti gli altri animali in tutto l'ambiente in cui vivono. Come questa conoscenza può influenzare ciascuno dipende dai risultati dell'interazione tra l'uomo e le altre specie. Gli animali ci mostrano il loro livello di benessere attraverso le loro reazioni comportamentali e fisiologiche al trattamento eseguito dall'uomo, e queste reazioni possono essere valutate e misurate. Prendendo in considerazione queste risposte implica che è inevitabile considerare l'importanza del concetto del benessere e le sue complesse implicazioni nell'interazione tra l'uomo e l'animale.

Da quanto esposto, si evidenzia che per sviluppare modelli condivisibili di valutazione del benessere occorre trovare definizioni altrettanto condivisibili relative a questo termine e conseguentemente utilizzare appropriati criteri per il suo studio.

Il benessere animale non riguarda quindi solo le condizioni di vita degli stessi, ma è di fondamentale importanza anche per la produttività e la qualità degli alimenti d'origine animale; quindi risulta intimamente connesso con il reddito dell'allevatore e lo stato di salute del consumatore, quasi a dire che l'astrazione del concetto si scontra con il suo stesso pragmatismo. Avere animali malati, infatti, significa ridurre l'efficienza dell'allevamento che a sua volta determina una riduzione quantitativa della produzione. Per una definizione più corretta del benessere animale, Carenzi e Verga (2007, in corso di stampa), suggeriscono che "la definizione più diffusa del benessere degli animali dovrebbe comprendere l'intero stato degli organismi, considerando insieme sia il corpo che la mente e i loro legami". Vale a dire, "il benessere di un animale è determinato dalla sua capacità di evitare la sofferenza e sostenere il buono stato di salute". Questa definizione è molto simile a quella fornita da Fraser e Broom (1990), secondo cui il benessere dipende dal "... grado di successo conseguito nel far fronte a condizioni difficili".

Riteniamo che questo tipo di definizione sia giusta (ed accettabile sia da filosofi che dagli scienziati), perché conferma che un buon livello di benessere non si raggiunge solo con l'assenza di difficoltà - come un'interpretazione semplicistica delle cinque libertà potrebbe suggerire - ma anche dalla capacità dell'allevatore di superarle attraverso la genetica, la gestione, l'alimentazione, l'igiene, l'ambiente sociale, ecc (Bertoni e Calamari, 2006). Pertanto, la misurazione del potenziale degli stressori, non può essere utilizzata da sola per definire il benessere, perché la stessa situazione può essere stressante o meno a seconda della genetica, l'esperienza, la fisiologia, ecc, degli animali, in altre parole alla loro capacità di superare le condizioni negative. Infine, questo tipo di approccio permetterebbe di evitare il rischio di non comprendere i sistemi di allevamento da parte dei consumatori, che molto spesso sono influenzati dalle loro soggettive e sentimenti antropomorfi.

Detto questo appare chiara la necessità di elaborare dei modelli in grado di fornire una valutazione accurata, precisa ripetibile e riproducibile del benessere animale.

Il primo passo da compiere allora sarà quello di scegliere gli indicatori del benessere più adatti a rilevare ciò che realmente si è interessati a conoscere.

2. STRESS E BENESSERE

2.1 DEFINIZIONE DEL CONCETTO DI STRESS

Lo stress è un fenomeno complesso che è stato studiato sotto diversi aspetti, questo è dovuto ad una molteplicità e varietà di prospettive degli studiosi che si occupano di tale argomento. Recenti sviluppi nella ricerca relativa allo stress hanno incrementato la conoscenza di come l'animale risponde agli stressori sia di natura fisica che psicologica. Gli animali allevati sono soggetti ad una notevole varietà di agenti stressanti (tra i quali per esempio la temperatura, l'alimentazione, o derivanti da elevati livelli produttivi ecc.); c'è un significativo aumento di interesse per gli stressori di natura psicologica o comportamentale poiché sono quelli che possono maggiormente interessare il benessere degli animali domestici. Inoltre, l'esistenza e l'importanza dei bisogni comportamentali o degli impulsi istintivi (per esempio l'esercizio, l'interazione sociale, o il controllo degli stimoli provenienti dall'ambiente esterno) e le implicazioni che il non consentire agli animali di estrinsecare il loro normale comportamento, possono provocare importanti problemi.

Le risposte comportamentali e l'abilità che gli animali hanno di adattarsi a condizioni di stress acuto e cronico rappresentano una tematica di notevole interesse.

Allo scopo di stabilire una valutazione onnicomprensiva della teoria dello stress, è utile dare una descrizione della sua evoluzione.

Il termine "*stress*" ha subito nel corso dei secoli, qualche modificazione del suo intrinseco significato. Infatti nella lingua inglese del 1600 il suo prevalente significato era quello di "difficoltà", mentre nel corso del 1800 la sua più comune accezione era virata verso il concetto di "tensione", tant'è vero che in quell'epoca il suo significato scientifico, per esempio nel settore della fisica, era quello di rappresentare, appunto la tensione che modifica qualsiasi materiale, il quale opponga una certa resistenza contro una determinata forza; forza che, agendo su di esso, tende ovviamente a modificarlo. In altre parole, dal punto di vista fisico, lo stress esprimeva la sommatoria (ed in alcuni casi la misura) di tutte le forze che agiscono contro la resistenza opposta da un corpo verso la propria deformazione (parola che viene detta "*strain*" in lingua inglese).

La traslazione alla biologia della parola "*stress*" venne effettuata per la prima volta da W.B. Cannon, che ne codificò ufficialmente il senso "biologico" (Cannon W.B., 1935). Egli utilizzava la parola in senso onnicomprensivo che coinvolgeva concettualmente tanto lo stimolo stressogeno quanto la reazione biologica da esso suscitata; fatto che creò qualche critica e qualche incomprensione da parte dell' "establishment" scientifico dell'epoca. Dai suoi studi è stato inoltre messo in evidenza che non solo gravi alterazioni dell'omeostasi, ma anche le situazioni avvertite come potenzialmente dannose o che richiedono la mobilitazione di tutte le energie e le difese dell'organismo

determinano la liberazione di adrenalina e l'attivazione del sistema simpatico. Tali situazioni sono accompagnate da intensa emotività, paura o aggressività.

Il concetto di differenti specifiche reazioni a particolari stressori ha predominato anche nel lavoro di Hans Selye (Selye H. 1950, e 1973 studi eseguiti sugli animali) alcuni decenni più tardi. Egli concentrò le sue numerose ricerche sulla scoperta che "l'organismo animale, indipendentemente dal tipo di stimolo a cui viene sottoposto reagisce sempre ad esso con la stessa sindrome aspecifica che si affianca a quella specifica legata al tipo di sostanza utilizzata" (Selye H., 1973). Tale intuizione fece seguito ad una molto nutrita serie di osservazioni che gli permisero di stabilire che l'organismo animale, ivi compreso l'uomo, possiede un modello generale di reazione aspecifica di tipo difensivo con cui è in grado di fronteggiare il danno derivante dall'impatto con qualsiasi agente potenzialmente patogeno. Da qui si arrivò a concludere che questa reazione aspecifica può essere definita come "*reazione da stress*" e che gli stimoli stressanti dovevano essere distinti dall'organismo e definiti con termini di "*stressor*" (Selye H., 1950). Egli constatò inoltre che in tutte le situazioni di particolare gravità, o di tensione dell'individuo con l'ambiente, l'organismo reagisce con l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, che determina la liberazione dei glicocorticoidi; tale fenomeno venne considerato come risposta adattativa comune ad una multiforme varietà di cause stressanti, di natura molto eterogenea: fisiche, chimiche, psichiche.

Tuttavia furono gli studi neuro-psico- biologici di J. W. Mason (1975) eseguiti sull'uomo, quelli che fissarono l'attenzione definitivamente sul fatto che sebbene lo *stressor* solleciti sempre una reazione biologica di stress, tale *stressor* provoca simultaneamente anche una stimolazione emotiva, sicché non può esservi stress biologico, senza una contemporanea attivazione emozionale. Un'ulteriore evoluzione del significato di questo termine si ebbe grazie alle ricerche di R.S. Lazarus, il quale, in varie pubblicazioni (Lazarus R.S., 1966 studi eseguiti sull'uomo) pose l'accento sul fatto che qualsiasi *stressor* non determina soltanto un'attivazione emozionale, ma provoca anche una valutazione cognitiva dal momento che l'uomo stressato, oltre a rispondere biologicamente, prende coscienza del fatto di essere stato stimolato da uno qualsiasi degli infiniti *stressor* fisici, chimici, biologici, ed anche psicosociali che possono colpire il singolo individuo.

Quindi alla luce di quanto detto si può dare una definizione di *stress* affermando che: "lo stress è costituito dal complesso dei fenomeni reattivi, che prendono il nome di "reazione di stress" simultaneamente ed integralmente somatici e psichici che si concentrano nell'uomo quando questi venendo sollecitato da uno stimolo (*stressor*) è indotto ad affrontare una situazione impegnativa al fine di fronteggiarla o superarla. Tale risposta è caratterizzata da varie combinazioni di risposte sia biochimiche che fisiologiche" (Selye, 1973).

Seyle elaborò due concetti fondamentali della teoria dello stress che sono il concetto di *eustress*, ovvero condizione in cui l'individuo ha successo con la sua capacità di adattamento psico-fisico a stimoli di diversa natura che derivano dall'ambiente esterno ad esso; mentre quello di *distress* indica una condizione di incapacità adattativa per l'individuo stesso che porta ad un logorio progressivo delle difese psico-fisiche dello stesso. In quest'ultima condizione quindi lo stress si concreta in maniera patologica, le condizioni di attivazione dell'organismo permangono anche in assenza di eventi stressanti o l'organismo risponde ad uno stimolo anche di lieve entità con una reazione esagerata; la definizione che ne viene data da un punto di vista veterinario è: “lo stato in cui l'animale non è in grado di adattarsi ad un ambiente esterno o interno alterato”.

Seyle inoltre suggerì che l'intensità o la durata dello stimolo a cui l'organismo deve rispondere potrebbe determinare un eventuale danno nell'organismo. Tale danno può avere diverse forme e può interessare diverse parti dell'organismo (per esempio, può essere rappresentato da una deposizione di sostanze grasse nelle pareti dei vasi sanguinei, ulcere nel canale alimentare, depressione della risposta immunitaria (Kelley, 1980), cessazione del ritmo di crescita alterazione della riproduzione) e in alcuni casi può determinare anche la morte dell'individuo.

Alcuni utilizzatori del concetto di *stress* hanno incluso nel meccanismo di risposta allo stimolo anche la rapida produzione di adrenalina/noradrenalina così come la relativa lenta secrezione dei corticosteroidi nella loro definizione, considerando che altri studiosi avevano invece incluso nella loro definizione anche le risposte biochimiche, fisiologiche e comportamentali.

Per non confondere le idee in merito a questo concetto, Ewbank (1973) suggerì che il termine *overstress* dovrebbe essere utilizzato per comprendere gli aspetti deleteri della risposta allo stress e quindi l'utilizzo del termine *stress* deve essere ristretto solo al meccanismo inoffensivo di adattamento; alcuni studiosi chiamano questo fenomeno *physiological stress*.

In alcune discussioni sul comportamento degli animali in relazione allo stress, è importante anche indicare l'intensità della risposta allo stress contro cui si sta valutando il comportamento dell'individuo.

Secondo Ewbank, l'uso del termine *distress* è parzialmente in accordo con quanto viene riportato nell'Atto del Parlamento Britannico (1968) che riguarda il benessere degli animali da allevamento in cui viene detto che il principale reato è quello di provocare un “inutile dolore o *distress* agli animali”, tuttavia questo collegamento tra il dolore e il *distress* suggerisce ad alcuni studiosi che tale termine dovrebbe essere utilizzato solo per descrivere una condizione di sofferenza interna all'animale; altri ritengono invece, che tale termine dovrebbe essere riferito solo ai segnali comportamentali esterni. Generalmente, comunque, questo termine copre lo stato interno e/o i segni comportamentali esterni di un individuo. L'autore, pertanto utilizza il termine per descrivere sia lo

stato fisiologico che quello psicologico dell'animale come espressione esterna del suo comportamento.

Il termine *stress* nell'allevamento degli animali domestici è stato più volte utilizzato liberamente con lo scopo di etichettare, giustificare o spiegare il fatto che numerosi fattori ambientali influiscono sugli animali e inducono inspiegabili perdite patologiche di produzione (per esempio perdite che si possono registrare dopo il trasporto di un animale o dopo lo svezzamento), oppure questa parola può essere utilizzata per spiegare reazioni eccessivamente pronunciate a comuni stimoli ambientali, come per esempio la sindrome di stress nei maiali che induce gli animali alla morte all'interno di pochi minuti dopo un cambiamento di gruppo, trasporto, tecnica di allevamento (Cassens et al., 1975).

Generalmente, gli animali da allevamento risultano essere molto inclini alle conseguenze non favorevoli dello stress, poiché la selezione genetica e la pressione derivante dai sistemi di allevamento ha orientato il loro metabolismo verso l'anabolismo invece che verso meccanismi di difesa che hanno un'essenza catabolica (Ludvigsen, 1955; Judge et al., 1966).

2.2 STRESS ACUTO E CRONICO

Lo stress può essere causato da differenti tipi di stressori che Sapolsky et al. (2000) hanno classificato in: acuti, sequenziali, episodici, ad intermittenza cronica, sostenuti, o anticipati. Lo stress può essere descritto bene in due condizioni in relazione alla durata dei conseguenti effetti: stress transitorio (*acuto*) o di lungo periodo (*cronico*). In ciascuno dei casi, una volta che il sistema nervoso centrale percepisce una minaccia, sviluppa una risposta che consiste in una combinazione delle 4 risposte generali di difesa: comportamentali, del sistema nervoso autonomo, neuroendocrino e immunitario (Moberg, 2000). Sebbene tutti e quattro i sistemi di difesa biologici siano disponibili per l'animale per rispondere ad uno stressore, non tutti e quattro sono necessariamente utilizzati contro tutti gli stressori. In particolare l'omeostasi viene mantenuta solo se sono coinvolti i primi due meccanismi di difesa; viceversa, quando tutti i meccanismi di difesa vengono implicati, alcune funzioni biologiche possono essere modificate negativamente e gli animali potranno essere in una condizione di *distress* (Trevisi E., Bertoni G., 2009).

Lo stress acuto si verifica in conseguenza di una situazione negativa di breve durata, o fisica, emozionale o psicologica, che generalmente consente un veloce e completo recupero del bilancio fisiologico; così il risultato finale è un adattamento completo. Tuttavia, questa condizione è semplice da definire ma non da misurare, poiché è causa di una risposta biologica veloce nell'animale.

Le situazioni di stress acuto sono molto numerose negli animali domestici per il fatto che le tecniche di allevamento non sono sempre rispondenti alle esigenze naturali, fisiologiche e comportamentali proprie di ogni specie. Le tecniche di allevamento, la costrizione, l'affollamento, l'inadeguatezza dei ricoveri, le situazioni di eccessiva competizione tra gli animali, il trasporto, la mancanza di attitudine al governo degli animali da parte del personale, le modalità e i tempi di somministrazione degli alimenti, la rottura dei ritmi biologici dell'animale, la mungitura, la tosa, l'eccessivo sfruttamento in genere sono tutte cause di stress sia acuto che cronico.

A differenza dello stress acuto, quello cronico è una condizione di continua stimolazione fisiologica (Mendoza et al., 2000). Questa si verifica quando il corpo viene sottoposto a numerosi stressori o subisce lo stesso stress acuto per diverso tempo; in questa condizione il sistema nervoso autonomo raramente ha la possibilità di attivare la risposta di rilassamento (per esempio la prolungata esposizione ad uno stress determina una variazione permanente nel livello di uno o più parametri in confronto a quelli normali).

Le conseguenze dello stress si riflettono in vari modi sul benessere e sulla produzione animale; l'effetto che probabilmente arreca un maggiore danno all'animale è la diminuzione delle difese dell'organismo verso gli agenti patogeni, come già precedentemente illustrato; questo comporta una mancata risposta immunitaria alle vaccinazioni degli animali stressati inoltre si ha una vera e propria patologia da stress cronico con la comparsa di alterazioni fisiche (come ad esempio l'ipertensione e l'ulcera gastrica, già indicate da Selye) e comportamentali: depressione, aggressività, stereotipie, nonché anomalie del comportamento sociale, sessuale e materno.

2.3 RISPOSTA DELL'INDIVIDUO ALLE CONDIZIONI DI STRESS ACUTO E CRONICO

L'esposizione a una varietà di eventi ambientali determina una vasta gamma di cambiamenti fisiologici, che vengono descritti in due tipologie principali: la *reazione di emergenza*, che è stata descritta da Cannon (1935) e che è relativa all'attivazione del sistema nervoso simpatico e della parte medullare delle ghiandole surrenali, che viene definita come una breve risposta di latenza che coinvolge fattori ormonali (catecolamine) che consentono al soggetto di mobilitare le sue risorse velocemente per il fabbisogno metabolico del "fight or flight"; e la *sindrome generale di adattamento* che è stata inizialmente descritta da Selye nel 1936 e caratterizzata dal rilascio dell'ormone adrenocorticotropo. Selye identificò in tale processo tre fasi fondamentali: reazione di allarme, reazione di resistenza o adattamento e fase di esaurimento. Tale sindrome è dunque un meccanismo difensivo con cui l'organismo si sforza di superare le difficoltà per poi tornare nel minor tempo possibile al suo normale equilibrio operativo e ristabilire quindi l'omeostasi. Tale sindrome può svilupparsi secondo due modalità: una *reazione da stress acuto* di breve durata,

consistente in una rapida fase di resistenza cui segue un quasi immediato e ben definito ritorno alla normalità e una *reazione da stress prolungata* con una fase di resistenza che può durare da molti minuti a giorni, settimane, anni, o anche tutta la vita. La risposta agli stressor è quindi un insieme di reazioni a catena che coinvolgono innanzitutto il sistema nervoso e il sistema endocrino con possibili conseguenze sul sistema immunitario agendo di conseguenza su tutto l'organismo.

Durante la reazione di allarme l'organismo percepisce lo *stressor*, ossia qualcosa di inaspettato, nuovo o insolito, in grado di rappresentare una difficoltà o un potenziale pericolo; l'organismo utilizza tutte le sue risorse disponibili per l'azione immediata, soprattutto secernendo ormoni in grado di provocare opportuni cambiamenti in determinate funzioni organiche. In questa fase avviene un'intensa produzione di catecolamine (adrenalina e noradrenalina) e di cortisolo sotto lo stimolo dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) e una rapida accelerazione del ritmo cardiaco. Questa secrezione di ormoni combinata con la stimolazione del sistema simpatico provoca numerose ulteriori reazioni organiche: aumento del catabolismo, vaso costrizione periferica accompagnata da facilitazione della coagulazione, la funzione digestiva tende ad arrestarsi, si verifica la contrazione della muscolatura scheletrica come per affrontare un'aggressione; l'irrorazione sanguigna diminuisce anche nelle aree del cervello specializzate all'elaborazione delle informazioni e alla soluzione dei problemi. Successivamente si ha la fase di resistenza, in cui l'individuo/l'animale si adegua alla percezione dello stressor; in questa fase assume un ruolo fondamentale l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (asse HPA) nella quale viene messo in atto un complesso programma sia biologico che comportamentale che sostiene la risposta allo stressor e si ha una sovrapproduzione di cortisolo che spesso ha come conseguenza la riduzione delle difese immunitarie dell'organismo. Infine si ha la fase di esaurimento che si verifica quando il "pericolo" viene percepito come superato o quando l'energia da stress comincia a scarseggiare, dal punto di vista biochimico, l'inizio di questa fase è caratterizzato da una rapida diminuzione degli ormoni surrenalici (adrenalina, noradrenalina e cortisolo) nonché delle riserve energetiche, la conseguenza è un'azione depressiva che inverte i processi organici delle reazioni da stress per riportare l'organismo alla funzionalità normale.

Per ragioni storiche e tecniche molte ricerche sono state concentrate sul sistema delle ghiandole surrenali, poiché molti stimoli determinano un aumento nel plasma sia dell'ACTH che dei corticosteroidi. Questa modificazione non specifica, è stata perciò proposta come definizione di stress operativa nella ricerca orientata sulla fisiologia. Pertanto, gli animali che mostrano una concentrazione più elevata di corticosteroidi rispetto al normale sono in una condizione di stress e le condizioni che determinano queste modificazioni ormonali sono definite come stressori.

I fattori psicologici sono efficaci tanto quanto quelli fisici nell'aumento dell'attività delle ghiandole surrenali dell'ipofisi se le concentrazioni dei corticosteroidi nel plasma sono utilizzate come indice per valutare gli stimoli provenienti dall'ambiente esterno. Per esempio le variazioni di ACTH e dei corticosteroidi nel plasma osservate in maiali esposti per 10 minuti a un nuovo ambiente o ad un inattesa stimolazione elettrica hanno mostrato il medesimo risultato: il raggiungimento della massima concentrazione dei corticosteroidi a 10 minuti dal trattamento (Dantzer and Mormède, 1981a). L'esposizione ad un nuovo ambiente è infatti un potente stimolo che ha il vantaggio di non indurre un dolore fisico mentre permette delle misure comportamentali sia qualitative che quantitative (Dantzer, 1977; Faure, 1975; Jones, 1977; Moberg et al., 1980).

Componenti fisiologiche della stimolazione proveniente dall'ambiente esterno possono anche influenzare l'attività delle ghiandole surrenali in contesti sociali: per esempio quando due maiali provenienti da due differenti box vengono posti nello stesso posto, si determinano dei comportamenti battaglieri accompagnati da un aumento dei corticosteroidi nel plasma. Le modificazioni endocrine dipendono dalla presenza o dall'assenza del combattimento e sono molto pronunciati negli animali subordinati rispetto a quelli dominanti (Arnone and Dantzer, 1980). Una lotta non è necessaria per far accadere una modificazione endocrina, la sola presenza di un animale dominante può determinare un aumento dell'attività delle ghiandole surrenali. Questi risultati indicano che le ghiandole surrenali sono sensibili alla componente psicologica degli stressori ambientali.

Tuttavia, un ulteriore passo avanti è quello di dimostrare che questa grande sensibilità dell'asse ipotalamo ipofisi surrene è infatti responsabile della reazione non specifica allo stressor.

Animali esposti al caldo o al freddo intenso hanno mostrato un aumento di corticosteroidi nel plasma (Alvarez and Johnson, 1973 per gli studi sui bovini; Blatchford et al., 1978 per gli studi sui maiali). Tuttavia, come è stato notato da Johnson and Vanjonack (1976), la risposta delle ghiandole surrenali sembra essere molto correlata con la reazione emozionale, come è indicato da uno stato di irrequietezza, ansia, e tentativo di fuga, rispetto alla qualità fisica dello stimolo termico. In animali esposti a freddo o caldo per un lungo periodo (condizione quindi di stress cronico) queste reazioni emozionali non sono presenti per un lungo periodo e i cambiamenti neuroendocrini dipendono dalla qualità fisica dello stimolo. I corticosteroidi nel plasma sono ridotti in animali esposti ad una condizione di stress da caldo cronico, tuttavia altri parametri quali l'umidità ambientale, il livello della produzione di latte, possono influenzare i cambiamenti neuroendocrini (Alvarez and Johnson, 1973; Marple et al., 1972 per gli studi sui maiali; Rhynes and Ewing, 1973; Vanjonack e Johnson, 1975 per gli studi sui bovini).

Durante la risposta ad uno stress acuto, il sistema nervoso centrale e l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene sono attivati e molti ormoni sono modificati con brevissimo lasso di tempo (pochi secondi o minuti) e vengono aumentati (catecolamine, ACTH, oppiacei, vasopressina, prolattina, glucagone, GH e glucorticoidi) o ridotti (serotonine, o gonadotropine). In aggiunta, ci sono altri effetti fisiologici o metabolici che possono sopraggiungere immediatamente o con un certo ritardo. Tra questi, il più comune è un aumento del battito cardiaco, ritmo respiratorio accelerato, la più alta pressione sanguigna, un aumento della energia derivante dalla mobilitazione (incremento di glucosio e NEFA), la stimolazione del sistema immunitario e la riduzione dell'appetito (Sapolsky et al., 2000). Sono state osservate delle altre modificazioni, tra cui la riduzione di alcuni metaboliti del plasma (potassio, Trevisi et al., 1992; Halperin and Kamel, 1998; magnesio, Seeling, 1994), un rallentato flusso del digesta nel rumine (Trevisi et al., 2007) e nello stomaco (Taché et al., 1999), ma un aumento del transito nell'intestino (Taché et al., 1999; Mayer, 2000). Sebbene i cambiamenti di alcuni indicatori siano molto pronunciati durante una condizione di stress acuto, molti di questi sono rilevabili solo in un breve periodo a seguito degli eventi. Quando lo stress cessa, il sistema nervoso centrale e il sistema relativo all'asse ipotalamo-ipofisi-surrene non vengono più stimolati e gli effettori degli ormoni coinvolti o gli ormoni ritornano a livelli basali.

In alcuni casi, la risposta omeostatica adattativa osservata durante uno stress acuto può aumentare il grado di benessere. Tuttavia i cambiamenti biologici e fisiologici indotti da uno stress acuto non possono essere usati come marker per la valutazione del benessere. Ciò nonostante, come è stato bene spiegato da Moberg (2000), il *distress* può anche risultare da una condizione di stress acuto, se il costo biologico è sufficiente da alterare le funzioni biologiche (per esempio interrompendo eventi biologici critici o deviando risorse da altre funzioni biologiche).

Durante una risposta ad uno stress acuto si ha la liberazione di catecolamine da parte della midollare del surrene, l'attivazione del sistema catecolaminergico centrale, l'attivazione corticale (colinergica), l'attivazione del sistema neurovegetativo simpatico. Contemporaneamente viene attivata la secrezione ipotalamica di CRH (*Corticotropine Releasing Hormone*), che è uno dei maggiori regolatori della secrezione ipofisaria dell'ACTH insieme alla vasopressina (VP) (Antoni, 1986), determina un aumento della secrezione di glicocorticoidi.

L'aumento della concentrazione plasmatica di ACTH che si verifica in questa condizione e che raggiunge il suo massimo livello tra 5 e 30 minuti dallo stimolo e diminuisce entro le successive 6 ore, dipende dalla natura e dall'intensità dello stimolo (Jia et al., 1992).

Queste prime reazioni determinano uno stato di allerta e di iperattività neuromuscolare, con la mobilitazione di tutte le attività nervose volte alla determinazione di una risposta comportamentale attiva che consiste nell'evitare o nell'affrontare la causa di danno, attuale o potenziale. L'animale si

trova preparato a reagire e sarà indirizzato dall'esperienza nella scelta di modelli comportamentali innati o appresi che verranno applicati in base all'identificazione dello stimolo e alla valutazione del contesto.

Durante una condizione di stress cronico, si verifica una continua reattività fisiologica (Mendoza et al., 2000). Questo accade quando l'animale ha acquisito numerose esperienze a molti stress ripetute ripetute allo stesso stress acuto o continuo; in questa situazione il sistema nervoso autonomo raramente ha una possibilità di attivare la risposta di relax (per esempio la prolungata esposizione allo stress causa una modificazione permanente al livello di uno o di molti dei parametri a confronto con uno dei valori usuali). In questa situazione si verifica una sovraesposizione agli ormoni dello stress che risulta da un "carico allostatico" come postulato da McEwen (1998) o da un costo biologico sufficiente da alterare le funzioni biologiche e ad indurre il *distress* (Moberg, 2000). In questa condizione l'adattamento dell'individuo non avviene con successo e quindi si verifica una condizione di "disadattamento" e McEwen (1998) descrive 4 situazioni che lo possono determinare: una condizione di stress frequente (caratterizzato da una ricorrente attivazione o inattivazione dei sistemi di stress); mancanza di adattamento a stressori ripetuti o dello stesso tipo; l'incapacità di spegnere tutte le risposte allostatiche dopo il termine dell'evento stressante ed infine le risposte inadeguate ad alcuni sistemi allostatici che provocano l'aumento compensatorio di altri sistemi.

In letteratura sono stati identificati tre modelli di risposta in base al tipo di stress a cui l'animale può essere sottoposto: il primo è caratterizzato da una desensibilizzazione della risposta dell'ACTH ad uno stimolo prolungato, ed una elevata risposta ad uno stress nuovo. Appartengono a questa categoria di stimoli gli stress di natura fisica e psicologica come una immobilizzazione ripetuta e continua e una prolungata esposizione al freddo (Hauger et al., 1992; Plostky et al., 1987); il secondo invece è caratterizzato da una mancata desensibilizzazione della risposta all'ACTH ad uno stimolo doloroso ripetuto, e da una elevata reattività ad un nuovo stress. Questo modello considera le seguenti tipologie di stimoli: la presenza di problemi ai piedi, disordini metabolici, condizione di ipoglicemia (Kiss et al., 1993). Il terzo modello è caratterizzato da un aumento piccolo e transitorio dei livelli plasmatici basali dell'ACTH seguito da una marcata attività prolungata ad un nuovo stimolo. Risposte di questo tipo si verificano nel caso in cui l'animale subisca uno stress osmotico prolungato derivante da una privazione dell'acqua o dalla presenza di del 2% di sale nell'acqua di bevanda (Aguilera et al., 1993; Chowdrey et al., 1991).

In un animale stressato cronicamente, la risposta all'ACTH che si verifica in conseguenza di un'esposizione ad un nuovo stressor rimane inalterata o aumenta rispetto a quella di un animale non stressato cronicamente. Questo accade malgrado gli aumenti elevati di corticosterone nel plasma,

suggerendo quindi la presenza di alterazioni nel meccanismo feedback dei glucocorticoidi. Inoltre, ricerche condotte sia *in vivo* che *in vitro* su ratti cronicamente stressati hanno mostrato che la sensibilità dell'ipofisi rispetto all'inibizione da glucocorticoidi esogeni è danneggiata durante uno stress cronico (Aguilera et al., 1993; Dallaman et al., 1992). Un possibile meccanismo che può essere considerato per l'insuccesso dei glucocorticoidi per inibire la secrezione di ACTH durante uno stress cronico è la diminuzione dei recettori per i glucocorticoidi nell'ipofisi e nel cervello e la modificazione dell'attività funzionale di questi recettori (Flores et al., 1992; Sheppard et al., 1990). Lo stress cronico coincide con uno stato di lunga durata (per esempio uno stile di vita o una malattia che dura da lungo tempo che hanno un effetto estremo e costante sullo stato emozionale e/o su quello metabolico dell'individuo), dal quale l'individuo non può recuperare pienamente e la cui intensità e durata della sofferenza contribuisce alla severità finale della risposta dello stesso (Webster, 1994). Questa stimolazione di lungo periodo della risposta di adattamento può determinare effetti diretti (calore, basso livello energetico, ansietà, sofferenza, ecc.) o indiretti (cambiamenti che si verificano a livello endocrino, immunitario, metabolico). Questi effetti sono responsabili di conseguenze pre-patologiche o patologiche vere e proprie che riducono il benessere (Moberg, 2000; Romero, 2004). Pertanto lo stress cronico è una condizione di mancato adattamento che può essere associata ad una diretta riduzione del livello di benessere; inoltre questa condizione può influire sull'esordio o sulla suscettibilità alle malattie e la progressione delle malattie anche quando c'è un'altra causa di malattia.

La misurazione della condizione di stress cronico è molto discutibile rispetto a quella dello stress acuto, come suggerito da Ladewig (2000), attualmente “non ci sono dei test specifici o altri metodi che possono essere usati per diagnosticare lo stress cronico”. In generale, un buon marker per lo stress cronico “deve portare a cambiamenti sottili e di lungo termine nella funzione fisiologica (per esempio a livello di sistemi endocrini, metabolici e immunitari) anche se gli individui si sono adattati alle loro condizioni di vita” (Kelly et al., 1997).

2.4 STRESS DA MALATTIA

Con il termine di stress da malattia si considerano tutti gli stressori che attivano il sistema immunitario e stimolano il rilascio del Mediatore Endogeno Leucocitario (LEM) ora definito come *Interleuchina 1* (Klasing, 1985). Questa ed altre citochine riducono l'efficienza della conversione degli alimenti in carne, uova e latte poiché la ripartizione dei nutrienti è alterata. Infatti tali citochine pro-infiammatorie convogliano i nutrienti in modo che non siano utilizzati ai fini produttivi, ma per sostenere la risposta a stati febbrili acuti, ad un metabolismo basale accelerato, a una spesa energetica di mantenimento sempre più elevata ed inoltre inducono la sintesi delle

proteine della fase acuta (Elsasser, 1992). Questo genere di stress non è necessariamente legato a malattie acute, ma anche a traumi (Lennard e Browell, 1993) ad esempio frutto di distocia più frequente nelle primipare, a parassitosi (Luyn e Northrop-Cleves, 1993), a processi infiammatori (Grimble, 1990), un esempio può essere dato dalla presenza di infiammazioni uterine a volte non particolarmente gravi ma diffuse e favorite dal periodo con bassi livelli di estrogeni nonché dalle infezioni originate da blande infezioni di Gram (-) opportunisti (Boundurant, 2001) e alle endotossine che sono liberate in condizioni diverse (Morley et al., 1989). Da non trascurare quali causa di rilascio di citochine, sono poi gli stress e fra questi il termico, che provocano danni di tipo ossidativo. Infine lo sviluppo di citochine può derivare dall'assorbimento di endotossine o traslocazione microbica per superamento della barriera intestinale a causa di una minore efficienza per ipossia (Shah e Walker, 2000), per anomalie del pH, per presenza di microrganismi patogeni o per altre cause di mal funzionamento della barriera intestinale cui fra l'altro contribuisce l'azione di fatti infiammatori altrove attivi (Wannemuheler, 1995).

Tutti i fenomeni enunciati in precedenza ed in particolar modo le malattie, che siano esse metaboliche o infettive, sono quindi giustificati dal rilascio delle citochine, una causa di riduzione del benessere.

In una condizione di stress cronico che può derivare dalla presenza di una malattia persistente nell'animale si può avere il rilascio di citochine pro infiammatorie: direttamente (Baught and Donnelly, 2003), o più probabilmente indirettamente, come conseguenza dell'aumento della predisposizione alla malattia (Broom, 2006; Broom and Fraser, 2007), causato dalla riduzione dell'efficienza del sistema immunitario. La malattia è attraverso il rilascio delle citochine, una causa di riduzione di benessere perché provoca dolore, frustrazione, anoressia, cambiamenti nel metabolismo ecc. Inoltre, il rilascio delle citochine pro infiammatorie, qualunque sia la causa scatenante, determina la sintesi e la produzione da parte del fegato di alcune proteine generalmente prodotte in quantità ridotta (aptoglobina, siero amiloide A, ceruloplasmina, α 1- glicoproteina acida ecc.) e chiamate proteine positive di fase acuta (+APP) (Bertoni et al., 1989; Cappa et al., 1989; Gruys et al., 1998; Colditz, 2002; Murata et al., 2004). Questa risposta fisiopatologica influenza l'ordinaria funzionalità del fegato; cioè causa della riduzione della produzione di altre proteine differenti da queste, tra cui le albumine, le apolipoproteine, le proteine per il trasporto delle vitamine liposolubili e gli ormoni (Cappa et al., 1989; Fleck, 1989; Gruys et al., 1998; Murata et al., 2004; Gruys et al., 2005; Bionaz et al., 2007; Bertoni et al., 2008), tali proteine sono pertanto chiamate proteine negative della fase acuta (-APP). In questa situazione altre funzioni normali del fegato, tra cui la gluconeogenesi (Elsasser et al., 2000) e l'escrezione della bilirubina (Assenat et al., 2004), possono essere ridotte.

Così oltre ai meccanismi ben noti degli effetti dell'inflammazione, specialmente quando sono prolungati, anche i cambiamenti nella funzionalità epatica possono essere di elevato interesse e possono essere un utile marcatore della condizione di stress cronico ("stress da malattia") nelle bovine da latte (Bertoni, 1999; Bertoni et al., 2008; Lomborg et al., 2008) come nei bovini da carne (Arthington et al., 2003; Arthington et al., 2005) e nei maiali (Pinheiro et al., 2007). In particolare, le proteine di fase acuta negative (-APP), rappresentano validi indicatori di stress cronico e possono quindi fornire una indicazione sulla riduzione del grado di benessere soprattutto nella bovina da latte durante la fase di transizione, come dimostrato in vari esperimenti (Bertoni et al., 2006a; Bionaz et al., 2007; Bertoni et al., 2008).

3. INDICATORI PER LA VALUTAZIONE DEL BENESSERE ANIMALE

Dalle molteplici definizioni di benessere animale enunciate nel precedente capitolo, appare evidente che su tale definizione ci sono più scuole di pensiero, ma più che di opinioni divergenti, potrebbe trattarsi di diversi aspetti del benessere, alcuni che si riferiscono maggiormente alla sofferenza dell'animale e ai problemi etici, gli altri riguardanti soprattutto le funzioni biologiche (Ruschen e de Passillé, 1992). Si può facilmente essere d'accordo con Fraser (1989) (citato da (Ruschen e de Passillé, 1992) che prende in considerazione i molteplici aspetti del benessere animale e ritiene pericoloso scambiare una parte del problema con il tutto; pertanto, ciò che sembra di rilevante importanza è come valutare il benessere e come scegliere gli indicatori più adatti da utilizzare.

Le conoscenze scientifiche su fisiologia e stato di salute degli animali, così come l'interpretazione del comportamento animale e la consapevolezza delle modalità con cui l'ambiente e il management influiscono sugli animali rappresentano elementi basilari per la valutazione del benessere. Conseguentemente la valutazione del benessere spesso è un'analisi multifattoriale che include indicatori dello stato di salute, osservazioni sul comportamento degli animali, descrizione degli ambienti di allevamento e informazioni sulle operazioni di routine e management.

I vari metodi di valutazione sono generalmente basati sulla misurazione di una serie di indicatori e possono che essere suddivisi in due categorie: *parametri ambientali* (che descrivono le peculiarità del sistema di allevamento e del management) e *rilievi sugli animali* (che descrivono il comportamento, lo stato di salute e le risposte fisiologiche degli animali allo specifico ambiente) (Sørensen et al., 1991). I parametri ambientali forniscono informazioni su come le strutture e il management possano condizionare il benessere animale, mentre i rilievi sugli animali si riferiscono più direttamente agli animali in questione ed al grado di adattamento degli animali all'ambiente in cui vengono allevati.

Una categoria, i parametri ambientali, o indicatori indiretti o fattori che influenzano o indicatori di risorse, descrivono le caratteristiche del sistema produttivo e del management, come la lunghezza delle stalle, impianti per la distribuzione di acqua e di alimento, disponibilità di spazio, qualità della lettiera, accesso al pascolo etc. La valutazione di queste caratteristiche è abbastanza semplice poiché molti di questi parametri sono relativamente facili, veloci e affidabili da rilevare. E' anche vero, che le registrazioni dei problemi di benessere basati sui parametri ambientali possono essere spesso utilizzate per diagnosticare le cause di uno scarso livello di benessere e di conseguenza a rimuoverle. D'altro canto questi indicatori indiretti conducono ad una "valutazione del rischio" della condizione di benessere, ma non ad una valutazione del loro reale effetto sulla condizione di benessere. Ci sono infatti molte prove che suggeriscono che un sistema di allevamento può essere applicato in diversi modi che interessano il benessere animale (Sørensen et al., 2001; Fregonesi and

Leaver, 2001) e gli animali rispondere in maniera differente alla stessa condizione non confortevole (Mormède and Dantzer, 1988).

Una seconda categoria di indicatori registra le reazioni degli animali ad ambienti specifici; i parametri di questa categoria sono definiti come parametri *animal-based* o indicatori diretti. Questi indicatori rientrano nelle categorie del comportamento, salute e fisiologia. Il livello degli ormoni dello stress, l'aggressione, la paura e il comportamento anomalo, i sintomi delle malattie e la mortalità sono esempi di alcuni di tali parametri. In questa lista, alcuni autori includono anche la risposta produttiva (Bertoni et al., 1999; Veissier et al., 2000; Verga et al., 2000). Gli indicatori *animal-based*, tra cui il comportamento e la salute, possono essere considerati come indicatori dei sentimenti degli animali e come misure dirette della condizione fisica. Altri invece considerano questi indicatori utili per la valutazione del "linguaggio del corpo", questo approccio potrebbe essere utile per rilevare gli stati come l' "apatia" o gli stati affettivi positivi che sono comunemente considerati rilevanti per il benessere (Winkler, 2006).

Il punto di partenza per l'individuazione degli indicatori indiretti di benessere è quello di definire le esigenze degli animali basandosi generalmente sulle Cinque Libertà (FAWC, 1993). Occorre quindi individuare una lista di indicatori capaci di rilevare il grado di soddisfacimento di tutte le esigenze degli animali.

Stress di natura fisica (ad es. alte o basse temperature, mungiture dolorose, strutture inadeguate, ecc.) possono determinare le medesime condizioni pre - patologiche che si avrebbero in presenza di anomalie fisiologiche. Purtroppo, la tolleranza degli animali a questi numerosi fattori di stress è ritenuta essere proporzionale all'importanza ed all'intensità del fattore stressante, ma contemporaneamente alla risposta del singolo animale (fattori genetici, esperienza individuale ecc.). Questo rende estremamente difficile dare un giudizio preventivo sulle conseguenze che i vari fattori di stress possano avere sugli animali (Bertoni, 1994). Ciò rende ragione della necessità di non limitarsi ad analizzare solo i punti critici dei sistemi di allevamento in relazione alle Cinque Libertà; ma come è stato anticipato da Grandin (1997): "occorre un'accurata valutazione delle reazioni degli animali, una combinazione tra osservazioni dei comportamenti e misure fisiologiche al fine di elaborare una misurazione corretta del livello di discomfort dell'animale".

Considerando sempre gli indicatori diretti, c'è abbastanza consenso in letteratura sull'idea che si debba valutare il benessere attraverso l'utilizzo combinato di vari tipi di indicatori, includendo quelli comportamentali, fisiologici e sanitari (Webster, 1997), oltre a quelli produttivi e riproduttivi (Curtis, 1985). La combinazione dei diversi tipi di indicatori, in grado di valutare i diversi aspetti del benessere, è dettata dalla constatazione che non è infrequente ottenere, utilizzando questi indicatori in maniera separata, risultati parzialmente in contrasto tra loro.

Il punto di avvio per la scelta di tali indicatori deve peraltro riguardare, per i diversi sistemi di allevamento, le principali cause di riduzione del benessere e le loro conseguenze sugli animali, poiché è da queste ultime che scaturiscono i suddetti indicatori. In tal modo si potranno selezionare quegli indicatori diretti più appropriati e che sono maggiormente influenzabili, per cui risulteranno più sensibili nella valutazione del benessere.

Secondo Waiblinger et al. (2001) gli indicatori di benessere utilizzabili in allevamento nell'ambito degli strumenti per la valutazione pratica del benessere dovrebbero rispondere ai seguenti requisiti:

- includere misure accurate e valide;
- essere facilmente applicabili da tecnici opportunamente addestrati;
- richiedere un tempo limitato per l'esecuzione in modo da poter effettuare misure ripetute in molte aziende;
- rilevare le cause di riduzione del benessere e quindi permettere di proporre miglioramenti nel sistema e nella gestione del sistema per migliorare le condizioni di benessere.

Non c'è pieno soddisfacimento di questi requisiti, almeno per una parte di indicatori diretti proposti in letteratura. Fra essi vi sono i parametri comportamentali che possono richiedere tempi lunghi. Ad esempio, i test sviluppati appositamente per valutare la difficoltà ad alzarsi degli animali (Sørensen, et al., 2001) e le relazioni uomo-animale (Waiblinger et al., 2001), richiedono tempi relativamente lunghi per osservare un adeguato numero di capi. Tuttavia questa situazione potrebbe cambiare nel prossimo futuro dal momento che sono disponibili sistemi per il controllo e la registrazione automatica del comportamento dei singoli animali o di gruppi di animali (Johnsen et al., 2001).

Tali sistemi, previsti nell'ambito della zootecnia di precisione, potranno essere utilizzati anche con queste finalità. La misura dei parametri dello stato sanitario sembra più agevole, avendo frequentemente la possibilità di accedere ai database sanitari, dove vengono obbligatoriamente registrati i problemi sanitari e le terapie utilizzate per i singoli animali. Tuttavia questi dati secondo Sørensen, et al. (2001) con i quali concordiamo, non sono sufficienti per valutare adeguatamente le condizioni sanitarie degli animali. E' preferibile quindi effettuare una serie di rilievi nell'ambito di un'ispezione su di un numero rappresentativo di animali all'interno della mandria.

Infine gli indicatori diretti consentono, parzialmente, di soddisfare al quarto requisito indicato da Waiblinger et al. (2001), cioè rilevare le cause di minore benessere. Per questo è necessario ricorrere all'impiego congiunto di indicatori diretti e indiretti, fra l'altro questi ultimi rispondono alle esigenze della normativa generale. L'impiego degli indicatori indiretti, unitamente a quelli diretti, per la valutazione del benessere è auspicabile anche per altri motivi; infatti, la determinazione di alcuni di essi è difficoltosa e richiede considerevoli risorse, e spesso quando si riesce a rilevarli, la loro interpretazione risulta difficoltosa e pertanto meno adatta per la valutazione

del benessere (Johnsen et al., 2001). Occorre inoltre considerare che il rilievo degli indicatori indiretti pone meno difficoltà nell'esecuzione dei controlli, poiché l'esame delle condizioni di allevamento è relativamente semplice e rapido (Johnsen et al., 2001).

Pertanto, in accordo con quanto riportato da Sørensen, et al. (2001) e da Johnsen et al., (2001) per lo sviluppo di un modello di valutazione del benessere è necessario basarsi su due tipologie di informazioni:

- informazioni riguardanti il sistema e la sua gestione;
- informazioni su come l'animale risponde all'ambiente in cui vive ed a come viene trattato.

Il primo tipo di informazioni è rilevabile attraverso gli indicatori indiretti e si può suddividere in sistema ed applicazione del sistema (management). Il secondo tipo di informazioni è rilevabile attraverso gli indicatori diretti e, secondo Sørensen, et al. (2001) include gli aspetti comportamentali e lo stato sanitario. A quest'ultimo tipo di informazioni noi aggiungiamo anche le performance produttive e riproduttive, nonché alcuni aspetti fisiologici.

3.1 INDICATORI INDIRETTI

Questi indicatori sono relativamente semplici da rilevare ed in questa sede si fornirà solo un elenco ed una breve descrizione dei più importanti indicatori indiretti.

Relativamente al sistema vengono inclusi sia l'housing che le aree esterne; è importante ai fini del benessere perché fornisce indicazioni circa le risorse per gli animali ed anche le limitazioni che ad esso pone. Gli indicatori utilizzabili includono informazioni sull'housing (caratteristiche delle strutture, impianti e attrezzature disponibili, ecc.) e per gli animali che vanno all'aperto anche informazioni sulla qualità del pascolo (disponibilità di ombra e ripari, distanza tra pascolo e zona di mungitura ecc.)

Un sistema di allevamento può essere tuttavia applicato in molti modi e queste modalità di applicazione possono influenzare non poco il benessere (Fregonesi e Leaver, 2001). Lo spazio disponibile per gli animali nel ricovero è un tipico esempio della modalità di applicazione del sistema che influenza il benessere; se infatti l'area di riposo è insufficiente, ma soprattutto la lettiera o le cuccette non sono adeguatamente gestite, gli animali saranno a disagio; potranno essere inoltre valutati i materiali utilizzati per la costruzione dei ricoveri e delle diverse attrezzature presenti (es. cuccette, cancelli, ecc.) con i quali gli animali possono venire in contatto; tali materiali non devono essere dannosi nei confronti degli stessi animali, e devono possedere caratteristiche per le quali ne risulti possibile un accurato lavaggio e disinfezione. I ricoveri ospitanti gli animali, oltre ad essere costruiti seguendo determinati criteri, devono essere mantenuti accuratamente affinché non si possano formare protrusioni o spigoli appuntiti che potrebbero causare ferite ai soggetti stabulati;

devono fornire degli spazi adeguati per tutti gli animali affinché possano muoversi, alzarsi o riposare senza una eccessiva fatica; devono essere asciutti, puliti e ben ventilati: infatti una adeguata ventilazione ha la funzione di rimuovere i microrganismi patogeni, l'umidità, la polvere e le emissioni gassose prodotte dagli animali stabulati all'interno delle strutture; devono garantire una adeguata illuminazione poiché essa è fondamentale sia per permettere agli animali una corretta regolazione dei propri ritmi circadiani sia per ispezionare agevolmente in ogni momento la mandria. La modalità di applicazione del sistema va interpretata in maniera ampia (Sørensen, et al. 2001), includendo anche il management giornaliero. Infatti, un appropriato layout del ricovero, opportuni strumenti ed attrezzature sono ritenuti essenziali allo scopo di preservare un management ottimale. Il management influenza direttamente il benessere per diverse cause: densità di allevamento in relazione allo spazio mangiatoia, alla disponibilità di abbeveratoi e al numero di cuccette; tipologia dei pavimenti, così come quantità e qualità del materiale di riempimento delle cuccette; strategia alimentare; condizioni igieniche dei passaggi, delle aree di riposo e delle spazzole eventualmente presenti; frequenza di interventi di mascalcia e dei bagni podali; controllo del microclima; quantità e qualità dei contatti umani; adattamento al contatto con l'uomo e opportune modalità di governo degli animali; frequenze di raggruppamento, ovvero opportune strategie utilizzate in occasione di malattie o del parto (presenza del box infermeria); distribuzione dei parti durante l'anno e variazioni dei differenti eventi che si susseguono in allevamento come quelli che possono causare dei picchi di numerosità all'interno di un settore, che portano ad un peggioramento sia delle condizioni all'interno del ricovero sia della possibilità di un'accurata sorveglianza degli animali; infine. Facendo riferimento al pascolo, i fattori che possono avere un impatto sulle condizioni di benessere sono: la durata del periodo di pascolamento, la disponibilità di acqua, la presenza di un rifugio e di un riparo dal sole e la tipologia dei passaggi da e verso la stalla.

Gli animali devono essere curati da uno staff adeguato sia in termini di numerosità, che di abilità, di conoscenza e di competenza professionale. Il personale di stalla è uno dei fattori che può maggiormente influenzare il benessere degli animali. I responsabili aziendali devono assicurarsi che le persone operanti in stalla siano motivate e competenti; esse devono costantemente controllare gli animali e l'ambiente circostante per cercare di prevenire gli eventuali problemi che possono affliggere la mandria. Ciò significa che lo staff necessita di specifiche conoscenze e abilità che si possono sviluppare attraverso l'affiancamento con personale già esperto, o mediante corsi di addestramento professionale. E' inoltre importante che gli animali, soprattutto quando sono giovani, vengano a contatto più volte con le persone in modo tale che non risultino spaventati o intimoriti nel momento in cui questi dovranno essere sottoposti a qualsiasi trattamento da parte dell'uomo.

3.2 INDICATORI DIRETTI

Per questi indicatori si farà solo qualche cenno per quelli di tipo comportamentale, produttivo - riproduttivo e sanitario; viceversa si svilupperanno in uno specifico capitolo gli indicatori di tipo fisiologico.

Per quanto attiene alla risposta degli animali, i parametri comportamentali sono ritenuti tra gli indicatori di benessere, quelli più sensibili (Veissier et al., 2000): infatti la prima reazione di un animale davanti ad una situazione avversa è quella di modificare il comportamento. Inoltre le risposte comportamentali sono spesso correlate con una risposta sia fisiologica che immunologica, come conseguenza di questo, quindi, gli indicatori comportamentali possono essere utilizzati per predire gli effetti dello stress sulle funzioni fisiologiche dell'animale. Essi permettono di prevenire la comparsa di patologie in quanto i ritmi d'attività sono modificati prima dello stato sanitario e della produzione e di rivelare delle piccole variazioni anche quando la maggior parte delle misure fisiologiche non variano. La specificità delle misure comportamentali permette talora di individuare il tipo di problema (per esempio le posture di riposo possono dare informazioni sullo spazio disponibile per l'animale, le attività orali o la finta masticazione sulla mancanza di attività); inoltre la frequenza di un comportamento anomalo è legata all'intensità della costrizione.

Tra le prime risposte comportamentali a un cambiamento ambientale ci sono le *reazioni di orientamento* (Sokolov, 1960 citato da Broom e Jhonson, 1993): l'individuo si gira in modo che gli organi di senso possono captare lo stimolo; le reazioni di orientamento non indicano sicuramente la presenza di problemi per gli animali, ma possono esserlo quando sono seguite da segnali di allarme, di difesa o da reazioni di fuga. Indicatori di disturbo per un animale sono le *reazioni di allarme*, la cui intensità è proporzionale al grado di malessere dell'animale. L'intensità di tali reazioni dipende dalle caratteristiche dello stimolo, dal contesto nel quale si manifesta e dall'esperienza che l'animale ha di esso. Tali reazioni possono essere molto differenti secondo la specie, ma anche individui della stessa specie possono avere risposte esattamente opposte. Queste reazioni comprendono la cessazione delle attività normali come il riposo, l'alimentazione e la toelettatura, a cui fanno seguito reazioni di immobilità, l'assunzione di posture che permettono la fuga, la difesa, il salto, o altri movimenti improvvisi, la produzione di suoni caratteristici. Di tali risposte può essere misurata l'intensità, la durata e la frequenza, che diventano indicatori di disturbo (Broom e Johnson, 1993).

Le risposte comportamentali possono essere utili nella valutazione del grado di dolore provato dall'animale in un periodo breve, con la limitazione che anche in questo caso la reazione varia da specie a specie. Le risposte più caratteristiche sono: cambiare posizione se i dolori sono addominali,

evitare l'uso di un arto dolorante, leccare la zona dolorante, fino ad arrivare a reazioni piuttosto energiche nel caso in cui venga toccata la parte dolorante (Broom e Johnson, 1993).

Tuttavia, l'interpretazione degli indicatori comportamentali è veramente difficoltosa poiché è necessario analizzare anche la complessità del sistema emozionale che è una componente importante del comportamento.

Nonostante le difficoltà di interpretazione, alcune sperimentazioni sono utili a fornire informazioni necessarie a comprendere se determinati comportamenti derivano da motivazioni interne, ma al momento, solo in pochi casi è stato verificato che la privazione di alcuni comportamenti ha un effetto sulle funzioni biologiche. L'importanza di un determinato comportamento può essere esaminata misurando le conseguenze fisiologiche della privazione del comportamento stesso. Ad esempio, i vitelli che dopo il pasto continuano a succhiare la tettarella di gomma, fanno registrare valori più elevati di insulina e colecistochinina rispetto ai vitelli che non hanno la possibilità di farlo e tale comportamento avrebbe, quindi, un significato fisiologico (de Paissillé et al., 1993). Gli animali ben adattati al proprio ambiente raramente perdono tempo ed energie in attività che non contribuiscono al loro buono stato riproduttivo e tali animali sono in grado di adeguare il loro comportamento ai normali cambiamenti del proprio ambiente.

Secondo Broom e Jhonson (1993) quando un animale ha dei problemi nel fronteggiare il proprio ambiente, manifesta sempre delle stereotipie. Una stereotipia è una serie di sequenze di movimenti relativamente invariati e ripetuti che non hanno una funzione ovvia, che spesso si manifestano quando all'animale manca il controllo del suo ambiente (Fraser and Broom,1990; Broom, 1991).

Sui comportamenti stereotipati la letteratura è vasta e non sempre concorde e numerose sono le teorie elaborate riguardo ai comportamenti stereotipati degli animali in cattività (Mason, 1991). Secondo l'opinione di molti studiosi, animali allevati in spazi confinati manifestano dei comportamenti che sarebbero chiari segnali di mancato adattamento. I maiali ad esempio, grufolano sul pavimento in cemento, fingono di masticare, mordono parti del box o della gabbia (Stolba e coll., 1984). Generalmente, gli animali tenuti isolati sono affetti maggiormente da atteggiamenti stereotipati di quelli allevati in gruppo e mostrano anche maggiore aggressività, comportamenti sessuali anomali e scarsa attitudine materna (Broom e Johnson, 1993).

Secondo altri autori, le stereotipie orali come il mordere le barre, arrotolare la lingua, fingere di masticare, sono strettamente correlate a problemi alimentari come la scarsa disponibilità di alimenti (Redbo et al., 1996).

Le stereotipie quindi sono un chiaro segnale di scarso benessere per gli animali e Danzter (1986) suggerisce che un comportamento caratterizzato dalla presenza di stereotipie è un segnale di una alterazione patologica della funzionalità del cervello.

Le osservazioni comportamentali includono oggi vari test standardizzati, finalizzati soprattutto alla ricerca, per misurare le relazioni tra animale e l'uomo (test paura –timore), il comportamento per valutare il comfort, come ad esempio la facilità con cui l'animale si alza, le interazioni sociali tra gli animali (Sørensen, et al. 2001), test per misurare la risposta allo stress in spazi aperti. Sfortunatamente però, esiste il problema dello sviluppo di un sistema di valutazione fattibile basato su indicatori comportamentali robusti e validi per l'uso in campo (Sørensen, et al. 2001).

3.3 PERFORMANCE E INDICATORI DELLO STATO SANITARIO DEGLI ANIMALI

Per quanto riguarda i dati sullo stato sanitario degli animali, già si è detto che non sempre gli interventi veterinari forniscono una precisa misura delle malattie; infatti la misura dello stato sanitario di un animale si deve focalizzare anche su esami clinici sistematici; ad esempio potrebbero essere osservati la presenza di lesioni cutanee, le laminiti, le condizioni esterne del corpo, gli ectoparassiti e le malattie cliniche. Si potrà inoltre valutare la pulizia dell'animale, poiché l'imbrattamento derivante dalle deiezioni può causare irritazioni della cute, inoltre la sporcizia e l'umidità hanno l'effetto di rendere più morbidi gli unghioni e la pelle e di conseguenza aumentare il rischio di infezioni, lesioni e contusioni; così il Body Condition Score (BCS) che è considerato un importante indicatore dello stato di vitalità e di salute dell'animale. Un BCS inadeguato può causare uno stato prolungato di malessere e un incremento della suscettibilità alle malattie a causa di ridotta capacità di difesa immunitaria; oltre a questo il BCS si può reputare come un indicatore di disordini metabolici, management sub ottimale o difficoltà croniche di interagire con l'ambiente circostante. Un altro indicatore della risposta degli animali al sistema ed al management è dato dalla presenza di lesioni a carico della mammella e delle condizioni dei capezzoli (Neijenhuis, 2000): nel primo caso la presenza di lesioni mammarie può causare uno stato acuto o cronico di sofferenza che può essere accentuato durante le operazioni di mungitura; sempre sulla mammella si possono rilevare le caratteristiche della punta del capezzolo valutando le sue modificazioni nel tempo, queste possono essere causate da un difetto nell'impianto di mungitura o nel management della mungitura, condizioni ambientali non corrette, dall'uso di prodotti chimici non adeguati durante questa pratica. Relativamente più facili sono i rilievi riguardanti le performance (produzione e qualità del latte, parametri riproduttivi, ecc.); anche se tali indici non possono essere considerati all'unanimità buoni indici per la valutazione di una condizione di stress di lungo periodo, infatti alcuni autori considerano che le elevate performance (per esempio la produzione di latte) possano rappresentare di per se una condizione di stress per l'animale o possano determinare un aumento della normale condizione di stress. Questo appare discutibile per noi, poiché suggeriamo che in condizioni di stress cronico (e quindi nel caso in cui il benessere venga ridotto) le performance delle bovine da

latte possono essere in accordo con il loro elevato merito genetico (Bertoni, 1999). Al contrario, disturbi fisiologici che sono conseguenza di stress cronico possono determinare marcati effetti sul metabolismo che possono essere associati a riduzione dell'ingestione di sostanza secca, cambiamenti nella fisiologia del canale digerente, bilancio energetico negativo, aumento della lipomobilizzazione e un aumento dello stress metabolico (Elsasser et al., 1995; Elsasser et al., 1997; Bertoni, 1999; Lay and Wilson, 2004). Tutte questi effetti possono quindi diminuire sia le performance delle bovine da latte (Webster, 1983; Bertoni, 1999; Trevisi et al., 2003 e 2006) che quelle del bovino da carne (SCAHAW, 2001; Broom, 2003). Nella nostra esperienza (Trevisi et al., 2003 e 2006) negli allevamenti in cui è presente una condizione di stress cronico (derivante da sovraffollamento, errori durante la routine di mungitura, nella gestione dei gruppi o nella tecnica di allevamento, dieta inadeguata) principalmente durante il periodo di transizione le bovine da latte hanno mostrato oltre ad uno stato inferiore di benessere un calo nella produzione di latte, un peggioramento delle sue caratteristiche qualitative (poco grasso e poche caseine) e un aumento nella perdita delle riserve corporee. Ovviamente, gli indici di performance (produzione di latte, qualità dello stesso e riduzione del BCS), non possono essere valutati considerando dei livelli assoluti, ma devono essere confrontati con il merito genetico della popolazione di riferimento.

Per quanto concerne le performance riproduttive, in condizione di stress cronico la bovina da latte è molto più suscettibile alle patologie infettive (Sheridan et al., 1994) che possono determinare un aumento del numero di servizi per gravidanza, oppure il numero di inseminazioni necessari per ottenere una gravidanza; inoltre tale condizione può determinare una riduzione della fertilità in quanto influisce negativamente sul rilascio sia del GnRH (Gonadotrophin –Releasing Hormone) che dell'LH (l'ormone luteinizzante) (Sapolsky et al., 2000 and Dobson et al., 2001) e sull' FSH alterando il normale funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi- ovario. Inoltre le disfunzioni ovariche possono anche essere indotte da un severo e prolungato deficit energetico, un'altra conseguenza dell'inadeguato management delle bovine ad elevata produzione.

L'inibizione del *Gonadotropine releasing hormone* (GnRH) può essere effettuata anche dal CRF; allo stesso modo anche l'ACTH e le β – endorfine, prodotte dallo stesso precursore, attraverso il sistema nervoso centrale, possono ostacolare la secrezione del GnRH e quindi la regolazione delle gonadotropine (Moberg, 1991). L'effetto dello stress nel lungo periodo può comportare anaestrosi, ovulazione ritardata o assente, cisti ovariche, manifestazioni estrali poco evidenti o addirittura assenti, riduzione del tasso di concepimento, mortalità embrionale e intervalli interestrili più lunghi (Romagnoli, 1994). Le principali cause di stress influenzanti la sfera riproduttiva sono riconducibili alle condizioni ambientali e alle tecniche di gestione: tra le prime va ricordato lo stress da caldo per le femmine appartenenti alla specie ruminante poiché queste hanno maggiore difficoltà a dissipare il

calore prodotto. In condizioni di ipertermia l'animale tende a ridurre la produzione di energia ed è perciò riluttante a muoversi e ad estrinsecare in modo evidente il normale comportamento estrale (Thatcher e Collier, 1986). Inoltre la vasodilatazione che ne consegue comporta una marcata riduzione dell'afflusso di sangue all'apparato riproduttivo e minore disponibilità di acqua, elettroliti, elementi nutritivi e ormoni; le conseguenze, senz'altro negative, di tutto ciò variano a seconda della fase del ciclo. Tra le cause di stress di origine manageriale con effetti negativi sulla riproduzione vanno ricordati la densità di allevamento, la numerosità dei gruppi e la stabilità sociale; anche al presenza di un individuo dominante e il frequente cambiamento dei gruppi possono interferire sul normale comportamento estrale e ciò è stato osservato in vacche, cavalle, pecore e scrofe (Freser e Broom, 1990). Anche il rumore eccessivo e condizioni climatiche estreme possono avere lo stesso effetto (Hurnik, 1987; citato da Broom e Johnson, 1993). Infine ci sono varie evidenze sperimentali dimostranti che situazioni di apprensione o mancanza di contatti sociali durante la prima parte della vita sono causa di problemi per quanto concerne l'attività sessuale dei maschi (Broom e Johnson, 1993). Inoltre, le disfunzioni ovariche possono anche essere indotte sia da un elevato bilancio energetico negativo che da una inadeguata gestione delle bovine da latte ad elevata produzione. Il bilancio energetico negativo può essere aggravato da una strategia di alimentazione inadeguata rispetto al livello di produzione di latte. Tuttavia alcuni altri fattori (tra cui per esempio l'aumento dello stato di ingrassamento prima del parto, condizioni di allevamento non favorevoli, stato di salute spesso collegato alla presenza di eventuali patologie metaboliche, uterine, agli arti ecc.) di differente origine, come suggerito da Formigoni e Trevisi (2003), possono essere responsabili per una marcata riduzione della sostanza secca ingerita e conseguentemente per un aggravato bilancio energetico negativo.

Secondo Broom e Johnson (1993) un altro parametro che può essere utile per la valutazione della condizione di benessere degli animali è la longevità, intesa soprattutto come "longevità funzionale" che non è da considerarsi come un vero e proprio indicatore delle performance degli animali. Tale indicatore considera l'abilità dell'animale di evitare la riforma involontaria, riforma causata principalmente da problemi riproduttivi o sanitari, che se di grave entità possono compromettere la carriera dell'animale e di conseguenza non renderne economicamente conveniente il suo allevamento.

3.4 INDICATORI FISIOLÓGICI PER LA VALUTAZIONE DEL BENESSERE ANIMALE

Gli indicatori fisiologici di benessere sono ritenuti validi e accurati, tuttavia richiedono tempi lunghi per la loro valutazione e costi generalmente più elevati per la loro determinazione. Per questi motivi tali indicatori non sono idonei per l'impiego in un modello di valutazione del benessere a livello di allevamento, ma possono essere utili nei sistemi di valutazione del benessere individuale nell'ambito della ricerca nonché per la validazione dei modelli di allevamento.

Riguardo al benessere siamo poco interessati ai cambiamenti nel breve periodo o a quello che avviene nelle situazioni di stress acuto; al contrario invece il nostro interesse è maggiormente rivolto agli indicatori di una condizione di stress cronico quasi sempre associato a benessere scadente.

Per risposte di breve periodo si intendono quelle che hanno la durata di poche ore, mentre si parla di lungo periodo quando queste durano uno o più giorni. L'animale che si trova di fronte a problemi persistenti, per adattarsi utilizza dei metodi diversi da quelli adoperati in caso di difficoltà di breve durata; ed è per questo motivo che secondo Broom e Johnson (1993), per la valutazione del benessere degli animali che affrontano problemi di più lunga durata non possono essere utilizzate le stesse misure impiegate quando le difficoltà persistono per poco tempo.

Per la valutazione del benessere di breve periodo gli indicatori che possono essere utilizzati sono:

- ematocrito: l'attivazione del sistema nervoso simpatico che si verifica nel corso di stress di natura fisica determina la contrazione della milza e del rilascio di eritrociti nel sangue con conseguente innalzamento dell'ematocrito. La milza rappresenta la principale riserva di eritrociti i quali vengono immessi in circolo quando i tessuti hanno un maggiore fabbisogno di ossigeno. L'innalzamento dell'ematocrito determina una maggiore disponibilità di emoglobina e rappresenta un meccanismo essenziale per il trasporto di ossigeno qualora i muscoli siano sottoposti a sollecitazioni più intense (Mundie et al., 1981);
- frequenza cardiaca: quando il livello di attività fisica di un animale aumenta e quindi aumenta il suo ritmo metabolico c'è un incremento della frequenza cardiaca (tachicardia). Tale parametro può essere utile per valutare la risposta emozionale di fronte a problemi sia di breve che lungo periodo nell'uomo (Appelhans and Leuken, 2008) e negli animali (von Borrel et al., 2007). E' però indispensabile distinguere tra effetti emozionali e metabolici ed occorre evitare che la misurazione disturbi troppo l'animale. Come per qualsiasi altro parametro utilizzato per stimare il benessere, è necessario conoscere bene la biologia dell'animale; infatti, in alcune specie, come risposta ad uno stimolo, si manifesta bradicardia durante la *reazione di orientamento*. E' importante anche tenere conto delle abitudini dell'animale; per esempio, pecore abituate al contatto con l'uomo, non hanno

- manifestano incremento nella frequenza cardiaca quando vengono isolate spazialmente o trasferite in un rimorchio (Baldock e Sibly, 1990 citato da Broom e Johnson, 1993);
- frequenza respiratoria: il ritmo respiratorio aumenta rapidamente quando gli animali sono disturbati. Sfortunatamente, questo e altri indicatori ad esso abbinati (quali per esempio tremori muscolari o bava alla bocca) devono essere interpretati con cautela perché diversi altri fattori (stress acuti o uno stato di salute non adeguato) possono influenzare la loro variazione;
 - temperatura corporea (rettale): la temperatura corporea è irregolare durante molte situazioni di stress, infatti ad esempio, essa aumenta durante gli episodi di infezione, quindi è un parametro che per essere utilizzato necessita di essere affiancato ad altri e di una metodologia per la sua rilevazione accurata che quindi fornisca dati validi;
 - indicatori metabolici: tali indicatori possono essere classificati in funzione del meccanismo in base al quale variano. Tra questi vanno inclusi: il glucosio e gli acidi grassi non esterificati (NEFA), i cui livelli aumentano rapidamente in condizioni di stress acuto. Alcune di queste situazioni di stress acuto (ad esempio trasporto, o paura) possono altresì comportare esercizio vigoroso e qualche volta danni muscolari; così alcuni enzimi aumentano marcatamente in tale condizione (creatinina, fosfo-chinasi, LDH e aspartato-transferasi);
 - catecolamine e i glucorticoidi: due sono gli assi principalmente implicati nello stress: l'asse simpatico-surrenale-midollare (SAM) e l'asse ipotalamico-pituitario-corticosurrenale (HPA). Le ghiandole surrenali sono una parte importante di entrambi i sistemi: queste sono localizzate in prossimità dei reni ed ognuna è costituita da 2 distinti compartimenti con funzione endocrina la midollare e la corticale. L'attivazione del sistema nervoso simpatico in situazioni di emergenza comporta il rilascio delle catecolamine, adrenalina e noradrenalina, dalla midollare delle surrenali. Il rilascio di questi ormoni avviene entro 1-2 secondi dalla percezione dello stimolo iniziale ed altrettanto rapido è il loro catabolismo. Le catecolamine sono anche responsabili della maggiore produzione di glucosio. L'asse HPA parte dall'ipotalamo dove viene prodotto il *corticotropo releasing factor* (CRF), il quale a sua volta, stimola la secrezione dell'ormone corticotropo (ACTH); tale ormone esercita la sua azione sulla corteccia surrenale dove vengono prodotti i glucocorticoidi. Nella maggior parte delle specie il tempo intercorrente per iniziare il rilascio di questi ormoni è di almeno 2 minuti, ma il loro effetto ha una durata molto maggiore di quella delle catecolamine. In seguito al rilascio dei glucorticoidi aumenta il rilascio in circolo di amminoacidi (proteolisi) e di acidi grassi liberi (meccanismo che non si verifica nei ruminanti). Una notevole

difficoltà nell'utilizzo del contenuto dei glucocorticoidi plasmatici come indicatori di benessere è la stessa risposta indotta nell'animale durante il prelievo di sangue. Si ritiene che tale misura sia valida se il campione di sangue è prelevato entro 2 minuti dall'inizio delle procedure di prelievo (Broom e Johnson, 1993);

- oppioidi endogeni: tra questi viene maggiormente studiata l'endorfina. Tale sostanza regola il rilascio di alcuni ormoni come il CRF, la prolattina, l'ormone della crescita, l'ossitocina e altri; esse agiscono anche sulle nostre emozioni, attenuando la percezione del dolore, regolando i ritmi sonno-veglia e l'appetito. La β – endorfina si forma dallo stesso precursore dell'ACTH e può essere riscontrata nel sangue insieme a quest'ultimo. E' stato dimostrato che il livello di tale sostanza aumenta quando gli animali sono sottoposti a stress di natura fisica (Mears and Brown, 1997).

Per la valutazione del benessere di lungo periodo, invece, si può ricorrere allo studio di numerosi parametri fisiologici, includendo le interrelazioni di questi parametri con i rilievi produttivi, riproduttivi e sanitari. In questo ambito si possono utilizzare indicatori della:

- la risposta immunitaria: una condizione di stress è spesso associata ad una alterazione della funzione immunitaria sia nell'uomo (Kelly et al., 1997) che negli animali (Salak-Johnson and Mc Glone, 2007). Entrambi, sia lo stress acuto che quello cronico tendono ad influire sul sistema immunitario, ma solo la condizione di stress cronico spesso ha un'azione immunosoppressiva, e come precedentemente sottolineato, può determinare un aumento dell'insorgenza delle patologie metaboliche e infettive che determinano una riduzione del grado di benessere. Tale relazione, sembra essere stata confermata anche in prove sperimentali condotte su maiali dominanti, infatti è stato dimostrato che tali soggetti sembra manifestino una marcata attivazione immunitaria (per esempio un aumento della citotossicità dei Natural Killer, che si realizza soprattutto in una condizione di stress cronico derivante da sovraffollamento o calore eccessivo secondo quanto riportato da Salak-Johnson and Mc Glone, 2007, un aumento del meccanismo di fagocitosi e un incremento della popolazione leucocitaria) quando si trovano a dover “sfidare” differenti agenti stressogeni, a differenza degli individui subordinati che sottoposti alla medesima condizione mostrano invece una soppressione del sistema immunitario (Salak-Johnson and Mc Glone, 2007).

In accordo con Salak-Johnson and Mc Glone (2007), la relazione tra lo stress cronico e il sistema immunitario appare “contraddittoria e difficile da ricondurre ad un insieme di teorie comprensibili e coesive universalmente applicabili, in particolare per le numerose funzioni del sistema immunitario che sono state studiate e per la discrepanza tra i risultati (Lay and

Wilson, 2004). In generale in una condizione di stress cronico si ha una soppressione di alcune funzioni immunitarie; in particolare, come è stato riesaminato da Salak-Johnson and Mc Glone (2007) la proliferazione linfocitaria è diminuita in maiali sottoposti a isolamento o in bovini giovani dopo un trasporto durato 3 giorni. Altri indici, tra cui la citotossicità delle cellule Natural killer non ha mostrato consistenti variazioni, infatti l'attività di queste cellule si è ridotta durante uno stress da freddo in maiali, ma è aumentata in conseguenza di altri tipi di stress (caldo e sovraffollamento). Tra i parametri che identificano la risposta immunitaria possono essere inclusi anche l'apoptosi linfocitaria, l'inibizione della produzione delle citochine pro-infiammatorie, la riduzione delle cellule mononucleari periferiche, la chemiotassi dei neutrofili, la produzione di anticorpi, l'aumento del rapporto tra neutrofili e linfociti, l'attività funzionale delle cellule mononucleari periferiche. I glucocorticoidi influenzano inoltre l'attività dei linfociti T e B (Pardue e Taxon, 1984), determinano la riduzione dell'espressione delle molecole di classe II (Snyder e Unanue, 1982) e la riduzione della produzione di citochine (IL-1, IL-2, IL-4, IFN- γ , ecc.).

Con un elevato livello di glucocorticoidi, il numero di linfociti circolanti si riduce con una linfopenia per quelli B, T e per le cellule natural killer e con una eosinopenia, al contrario il numero di neutrofili aumenta (neutrofilia); pertanto nelle specie con un numero relativamente basso di linfociti (bovini, pecore e maiali), il risultato netto è dato da un aumento della conta leucocitaria (leucocitosi), mentre in altre specie (per esempio i polli) si verifica invece una riduzione dei leucociti circolanti (Broom, 2006). Durante una condizione di stress cronico, il rapporto tra neutrofili e linfociti mostra una condizione di marcato incremento; questo è in accordo con quanto osservato da Nemi (1993) il quale ha trovato un rapporto neutrofili-linfociti superiore ad 1 in bovine adulte che sono state sottoposte ad uno stress prolungato o che magari hanno subito una condizione infiammatoria prolungata, questo quindi suggerisce l'utilità di tale rapporto nella determinazione dello stress cronico. Risultati ottenuti da prove sperimentali condotte presso l'Istituto di Zootecnica (Bertoni et al., 2003; Trevisi et al., 2003) sulle bovine da latte e quelli ottenuti sui vitelli (Riondato et al., 2008) sembrano confermare l'utilità di questi due parametri nel bovino. Tuttavia, la sua misura nel campo è alquanto complessa e richiede attenzione poiché qualsiasi malattia può modificare velocemente il numero e la tipologia di queste popolazioni di cellule immunitarie circolanti nel sangue. Nelle bovine, è stato utilizzato un test basato sulla valutazione dell'attività funzionale delle cellule mononucleari del sangue periferico (PBMC) per dimostrare la situazione compromessa durante lo stress da caldo (Lacetera et al., 2006). Un ulteriore indicatore per misurare la condizione di benessere è stato suggerito da Amadori

(2007), i quali avevano trovato bassi livelli complemento emolitico (una misura alternativa del complemento definita come properdina) durante la condizione di stress cronico. Questa via metabolica alternativa dell'attivazione del complemento è abile a riconoscere le strutture ripetitive dello zucchero incluse nella parete dei virus e dei batteri; in aggiunta questa via metabolica attiva il classico sistema del complemento. Pertanto, la sua riduzione può anche spiegare la ridotta abilità di reagire contro i patogeni. Il contenuto delle immunoglobuline del sangue o del colostro non sembra essere correlato strettamente al benessere nel lungo periodo (Broom e Johnson, 1993). La produzione di anticorpi, conseguentemente all'inoculo di antigeni, sembra invece essere accettabile come indicatore di benessere nel lungo periodo. Il monitoraggio della risposta immunitaria come indicatore di benessere in zootecnia ha principalmente riguardato la produzione di anticorpi (immunità umorale), la reazione di ipersensibilità ritardata (immunità cellulare aspecifica) e la risposta linfoproliferativa a mitogeni (immunità cellulare aspecifica) o ad antigeni (immunità cellulare specifica). La risposta anticorpale viene generalmente indotta iniettando in muscolo o sotto cute un antigene (i più usati sono il keyhole limpet hemocyanin e l'ovalbumina); nelle settimane successive all'inoculo che può essere seguito da un richiamo, si segue l'andamento della produzione di anticorpi. Esempi di questo tipo riguardano bovini (Pollok et al., 1992); bufali (Grasso et al., 1999), ovini (Napolitano et al., 1995), suini (Bonnette et al., 1990);

- lo stato di salute: la relazione negativa tra stato di salute e benessere è evidente, specialmente per la terza libertà, quella dal “dolore, dalle ferite, dalla malattia”. Da tempo è ormai noto che uno stato di salute non ottimale è causa di sofferenza fisica e di depressione psicologica; inoltre il danno alla salute è una conseguenza dello stress cronico; quindi può instaurarsi un circolo vizioso: basso benessere, immuno-depressione, malattie, basso benessere.... Qualsiasi tipo di patologia comporta una riduzione di benessere in maniera variabile e ognuna di esse può essere causata da fattori genetici, lesioni di natura fisica, termica o chimica, infezioni e infestazioni, disordini nutrizionali, o anomalie metaboliche. Gli indicatori di salute possono essere individuali o possono essere anche rilevati a livello di allevamento; ottimi esempi di indicatori di salute esterni sono stati forniti da Rousing et al. (2001), tuttavia, nel caso della valutazione del benessere delle singole bovine, i seguenti aspetti e parametri clinici possono essere valutati: aspetti generali (BCS, pulizia del pelo e luminosità delle pupille), pelle (parassiti, infezioni, lesioni, ecc.), arti (zoppie, cura dei piedi); qualità della mammella (mastiti cliniche, lesioni ai capezzoli). Malattie sistemiche possono essere diagnosticate in singole bovine tramite l'osservazione delle condizioni generali, alla temperatura corporea, al ritmo respiratorio, secrezioni anomale (dal naso, dalla

bocca e dalla vulva) e problemi digestivi (ritmo della ruminazione e feces score); alcuni di questi indicatori devono essere “aggiustati” nella loro interpretazione in accordo con gli stadi fisiologici e produttivi delle bovine; ad esempio considerare i giorni lontani dal parto può essere importante per la loro valutazione. I parametri ematici ed il latte possono essere utili per la definizione nelle condizioni di salute quali: malattie metaboliche (elevati corpi chetonici, basso rapporto proteine/grasso nel latte indicano un bilancio energetico negativo mentre l’urea è un soddisfacente indice di ingestione delle proteine; ci sono altri parametri ematici che possono risultare utili per la valutazione dello stato metabolico ottimale tra cui: i minerali presenti nel sangue, altri metaboliti energetici, enzimi del fegato);

- l’incidenza delle malattie, infatti è stata osservata una maggiore suscettibilità ad agenti patogeni di varia natura, alle malattie metaboliche (Broom, 2006; Broom and Fraser, 2007) e alle infezioni (Sheridan et al., 1994) in diverse specie di interesse zootecnico: nei polli lo stress da sovraffollamento facilita l’insorgere di infezioni virali e da micoplasmi (Siegel, 1987). Chiang et al. (1990) hanno riscontrato una maggiore suscettibilità ad *Haemophilus sommus* in vitelli trattati con gli corticoidi esogeni, mentre esemplare è il caso del cervo (*Cervus elaphus*) in cui lo stress dovuto alla recente domesticazione ha comportato una suscettibilità alla tubercolosi molto più marcata (Griffin et al., 1990). Il peggioramento dello stato di salute ha comportato quindi l’attivazione di tre possibili meccanismi, come proposto da Broom (Broom, 2006 e Broom e Fraser, 2007): l’attivazione cronica del meccanismo fisiologico di adattamento in caso di stress cronico che determina una immunodepressione e allora l’insorgenza di patologie di natura infettiva; il meccanismo di adattamento comportamentale che determina l’insorgenza di comportamenti anormali, sempre successivi a danni di natura fisica; il possibile stress metabolico derivante da numerosi fattori (management, selezione genetica, errori nel razionamento) che determinano lo sviluppo di patologie della produzione;
- parametri endocrini tra cui l’adrenalina e la noradrenalina, prodotte dalla midollare del surrene, non possono essere utilizzate per la valutazione del benessere nel lungo periodo; come anche il contenuto di glucocorticoidi presenti nel sangue, nelle urine e nella saliva. Tuttavia un campionamento regolare effettuato nell’arco di più ore o più giorni senza arrecare disturbo all’animale, permetterebbe di valutare il benessere di animali che sono allevati in situazioni differenti. L’interpretazione dei risultati può risultare però alquanto difficile. In tori tenuti a stabulazione libera, sottoposti ad un prelievo l’ora tramite catetere, la media giornaliera del cortisolo non ha fornito indicazioni utili mentre l’ampiezza dei picchi si è mostrata essere maggiore nei tori a stabulazione fissa (Ladewig e Smidt, 1989). Il

principale motivo per cui i glucocorticoidi non sono ritenuti validi indicatori di benessere è la possibilità di adattamento ad uno stimolo che l'animale riceve ripetutamente, perciò la mancata risposta di questi ormoni non significa necessariamente che il problema è stato superato. Infatti, in presenza di stress che si protraggono nel tempo i livelli di ACTH e glucocorticoidi tornano ai livelli basali in breve tempo. L'utilità della determinazione del cortisolo verrà trattata in uno specifico capitolo;

- le *β-endorfine* sono un prodotto della divisione della propriomelanocortina, anche essa un precursore dell'ACTH, formata nella parte anteriore della ghiandola surrenale. Si suppone che le β-endorfine producano un maggiore effetto nel SNC, dove interagiscono con i recettori degli oppioidi; per questa ragione queste sostanze sono coinvolte nel dolore, nell'invecchiamento cerebrale, nel comportamento con il rispetto dei sentimenti, nell'ingestione della sostanza secca e nelle emozioni, questo è il motivo per il quale tale parametro è interessante ai fini della valutazione dello stress cronico. Sebbene le β-endorfine sembrano essere utili per la riduzione della percezione del dolore, in maniera simile alle droghe tra cui la morfina e la codeina, Osawa et al. (2000) hanno riportato un aumento di questo ormone come risposta ad una varietà di stressori. Questi elevati livelli di β-endorfine al momento del parto nelle bovine da latte che hanno mostrato dei problemi (distocia o ritenzione di placenta) rispetto ad animali che hanno avuto un puerperio normale. Questo ha suggerito che molte situazioni dolorose richiedono un elevato livello di ormoni narcotizzanti. Pertanto, sono necessari ulteriori dati per chiarire l'effettiva relazione tra le β-endorfine e lo stress cronico, per una migliore interpretazione del suo livello basale; inoltre è opportuno osservare che tali parametri tendono ad essere più stabili nel medio-lungo periodo rispetto ad altri indicatori plasmatici quali il cortisolo.
- *altri ormoni*: in aggiunta all'ACTH challenge, sono stati proposti altri due challenge ormonali per valutare lo stress cronico: le variazioni nella reattività delle ghiandole surrenali alla stimolazione con CRH (CRH test) e le variazioni della secrezione di CRH dovuta al controllo dei glucocorticoidi (dexamethasone test). Alcuni autori hanno applicato questi due test (Fisher et al. 2002), ma i risultati non sembrano incoraggiare il loro utilizzo nella valutazione dello stress cronico;
- il *potassio* e la *fosfatasi alcalina*: il potassio è un elettrolita principalmente presente nel citoplasma, è coinvolto in alcuni processi cellulari (per esempio equilibrio acido base, regolazione dell'attività delle membrane). Il suo livello nel plasma è costante e fenomeni che ne possono giustificare una riduzione (per esempio il digiuno, l'alcalosi, disfunzioni renali, l'utilizzo di diuretici) sono rari. L'ipocaliemia può essere determinata da alcuni

ormoni (insulina e catecolamine per esempio), che promuovono lo spostamento di ioni K^+ nelle cellule (Halperin and Kamel, 1998), o da una condizione di stress cronico (nella bovina da latte come quanto riportato da Trevisi et al., 1992). Questo effetto ipocaliemico sembra essere promosso dagli ormoni collegati allo stress (per esempio ossitocina e epinefrina) che spesso sono causa di un aumento dell'escrezione di potassio dal rene.

La fosfatasi alcalina è un enzima non specifico abile a idrolizzare differenti tipi di esteri fosfati. Nel sangue, la fosfatasi alcalina è rilevabile nelle differenti isoforme come espressione dell'organo di origine (osseo, fegato, rene e placenta) e può essere marcatamente ridotta in alcune situazioni patologiche (es. marcata anemia, lipidosi epatica, deficienza di zinco). Durante lo stress da caldo, principalmente nelle bovine primipare, Wazhapilly et al. (1992) hanno segnalato una marcata riduzione nella fosfatasi alcalina e questo risultato è stato confermato da Abeni et al. (2007). Inoltre, una riduzione nella fosfatasi alcalina è stata anche segnalata in altre condizioni stressanti, come il cambiamento di gruppo e l'elevata densità di bestiame nella bovina da latte (Calamari et al., 2003) o come conseguenza dello stress sociale nei maiali (Tunchscherer et al., 1998). In ciascun caso, entrambi questi indici (potassio e fosfatasi alcalina) necessitano di ulteriori ricerche per essere confermati come marcatori affidabili dello stress cronico;

- le *proteine glicate*: l'elevato livello di glucosio e/o il suo frequente aumento nel sangue, entrambe condizioni relative a stress ricorrenti (principalmente derivanti dall'effetto dell'epinefrina e del cortisolo), sono stati correlati alla formazione delle proteine glicate, derivanti dal legame tra il glucosio o un altro zucchero riducente con le proteine. L'eccessivo livello di tali proteine determina alcuni pregiudizievole effetti, tra cui l'inattivazione di alcuni enzimi, l'inibizione dei legami delle molecole regolatrici, inappropriata reticolazione delle proteine, rallentata rimozione delle proteine anomale e alterata funzione del genoma (Kelly et al., 1997). Per questa ragione esse sono state studiate come possibili marcatori dello stress cronico. In uno specifico capitolo verrà trattato il significato della determinazione delle proteine glicate nei riguardi del benessere.

Dall'analisi delle differenti misure per la valutazione del benessere animale emerge chiaramente che gli strumenti che possono essere utilizzati devono essere affinati e che allo stato attuale delle conoscenze il rischio di ottenere risultati poco attendibili è elevato. La strada più corretta da percorrere prevede quindi l'utilizzazione di più parametri a cui andrebbe affiancata la conoscenza della fisiologia e dell'etologia della specie considerata nonché delle condizioni di allevamento.

3.5 MARKERS DELLO STRESS CRONICO

Una varietà di parametri comportamentali, fisiologici, biochimici, immunologici e patologici sono stati proposti come candidati della sensibilità dell'animale allo stress cronico e pertanto, utilizzabili in una valutazione obiettiva del benessere animale. Tra questi parametri, diversi non sono misurabili in breve periodo (per esempio gli indicatori del comportamento normale o l'incidenza delle patologie) e in aggiunta alcuni possono essere misurati solo con metodi qualitativi (per esempio gli indicatori comportamentali).

Gli indicatori fisiologici e biochimici sembrano essere molto affidabili e oggettivi, sebbene la conoscenza riguardante alcuni di questi parametri sembra essere controversa o non esaustiva. Una possibile spiegazione per la mancanza di accordo sull'uso di questi indici è la standardizzazione insoddisfacente. Qualunque parametro è necessario per accertare sia i suoi livelli basali che come cambiamenti nel corso del tempo (Broom, 2003) e in accordo con le comuni condizioni di vita di un animale (per esempio il ritmo circadiano, momento della lattazione, età, distribuzione dell'alimento, e altre tecniche di allevamento). Per questa ragione, prima di suggerire l'utilizzo di certi indicatori di benessere, sono necessari accurati studi per verificarne i livelli basali.

Ovviamente gli indici più utilizzati sono quelli che hanno mostrato una minore variazione con il rispetto dei valori basali in risposta alle condizioni di vita comune, ma maggiori variazioni nella risposta ad uno stress cronico. Kelly et al. (1997) hanno proposto una lista dei più importanti criteri per i markers ideali di risposta allo stress cronico nell'uomo che includono le seguenti caratteristiche: influenzati/creati/causati sostanzialmente dal distress; hanno una emivita breve; non richiedono misure ripetute; sono indipendenti da fattori demografici (sesso o età); sono facili o poco costosi da misurare e non richiedono una speciale preparazione del campione. Si può assumere che questi criteri sono anche largamente pertinenti per gli animali, sebbene pochi indicatori biologici hanno i requisiti illustrati precedentemente.

4. MODELLI DI VALUTAZIONE DEL BENESSERE ANIMALE

Per quanto riguarda i modelli di valutazione del benessere nell'ambito della ricerca, i ricercatori dell'Istituto di Zootecnica di Piacenza hanno ipotizzato due livelli di applicazione:

- il primo livello è in grado di consentire studi per quanto possibile approfonditi sulle conseguenze che il malessere esercita sulle performance degli animali appartenenti ad un allevamento (produzione, sanità, attività riproduttiva ecc.), ma anche sulle conseguenze che i diversi sistemi di allevamento possono avere sugli animali in tal modo allevati (es. intensivo vs estensivo, innovazioni tecnologiche a vari livelli ecc.). E' chiaro che il grado di approfondimento di tale livello sarà maggiore rispetto al modello di campo, e pur variabile a seconda delle disponibilità tecnico-scientifiche del momento, dovrà da un lato ricorrere agli indici individuali più sofisticati, ma al tempo stesso tener conto del costo/beneficio in quanto il significato di tali indici individuali si dovrà comunque riferire all'allevamento, per cui andranno eseguiti su appropriato numero di individui con ovvii problemi di rappresentatività statistica e quindi di costi e di tempi richiesti;
- il livello di verifica oggettiva sul singolo individuo (che ovviamente può essere in una situazione più o meno favorevole rispetto alla generalità degli individui appartenenti all'allevamento). L'interesse per questo tipo di verifica può essere molteplice: capire l'origine della diversa suscettibilità ad ambienti poco favorevoli (es. per ragioni genetiche, oppure perché sperimentalmente trattato in qualche modo ecc.), ma anche e più semplicemente per sperimentare nuove soluzioni di qualsivoglia tipo (edifici, attrezzature, alimentari, ecc.). Si tratta chiaramente del livello di massimo approfondimento possibile e necessario soprattutto per lo studi del benessere in sé, dei fattori di variazione e delle conseguenze di tale variazione; i limiti a tale approfondimento sono prevalentemente di potenzialità oggettiva di chi li esegue, di competenze specifiche (continuamente aggiornabili per ovvie ragioni) e di costo.

Il primo livello si può prendere in considerazione per elaborare modelli di valutazione del benessere utili alla validazione dei modelli semplificati per la valutazione in campo del benessere.

Alla luce delle difficoltà messe in luce in precedenza, è evidente che il modello di valutazione del benessere necessita di una validazione. Anche da questo punto di vista, le difficoltà sono numerose dal momento che non esiste un *gold standard* di riferimento per il benessere e per i suoi diversi aspetti. La validazione è una prova della precisione con la quale una misura viene rilevata, invece, l'attendibilità esprime invece lo scarto esistente tra due misurazioni dello stesso campione (McDowell & Newell, 1987; Thrusfield, 1995).

I modelli per la valutazione del benessere animale proposti dalla letteratura sono molto differenti e queste differenze possono essere dovute in parte al fatto che essi hanno diversi obiettivi. Main et al. (2003) hanno fornito una breve panoramica dei differenti modelli proposti per valutare il benessere animale e hanno categorizzato questi modelli in: modelli utili per la ricerca, modelli utili per le esigenze legislative (non volontario), sistemi di certificazione (volontari) e modelli utili per eseguire consulenze aziendali/o come strumenti di gestione tecnica; questo in accordo con i loro vari obiettivi: quantificazione del benessere; quantificare le condizioni che dovrebbero assicurare il benessere o il management del benessere. In base a questa classificazione si possono suddividere i modelli di valutazione del benessere in due grandi categorie: modelli per la valutazione del benessere a livello di allevamento e modelli per la valutazione del benessere nell'ambito della ricerca.

I modelli per la valutazione del benessere animale sono in generale basati su un range di parametri o indicatori di benessere. E' prima di tutto necessario definire due proprietà di questi indicatori, vale a dire validità e affidabilità (Scott et al., 2001).

La validità considera il livello con cui un insieme di parametri effettivamente valutano ciò che si sta ipotizzando; ci sono due forme di validità: "la validità formale" che è rappresentata da un giudizio soggettivo e la "validità sostanziale" che giudica se il modello di valutazione include tutti gli elementi considerati per racchiudere i domini del benessere. Un modello di valutazione del benessere animale è valido se dimostra una relazione con entrambe le misure esistenti o con quelle relative al *gold standard* (Cohen et al., 1986). Nel caso del benessere animale invece, poiché non esiste un *gold standard* questo criterio di validità deve essere dimostrato dalla comparazione con altri metodi validi e affidabili (Cohen et al., 1986). La validità è verificata attraverso la formulazione dell'ipotesi circa la relazione tra il benessere ed altre variabili; questa ipotesi può essere poi investigata (Cohen et al., 1986). Se la relazione che era stata ipotizzata è confermata, il modello risulta valido. Nel caso del benessere, che non può essere misurato direttamente e per cui esistono diverse definizioni, la validità di ciascun modello utilizzato per la sua valutazione deve essere investigato completamente prima che questo sia accettato per un utilizzo generale.

L'affidabilità, invece indica quanto le misurazioni che vengono eseguite siano simili le une con le altre. Questo parametro è generalmente quantificato come un coefficiente compreso tra 0 e 1 ed è il rapporto tra la variabilità osservata tra i punteggi dei soggetti e quella totale osservata.

Ci sono differenti misure di affidabilità: affidabilità tra osservatori, che misura l'accordo che è presente tra i differenti osservatori; l'affidabilità all'interno dello stesso osservatore, che misura la concordanza tra i rilievi eseguiti dalla stessa persona in occasioni differenti, ed infine l'affidabilità del test che viene nuovamente testata e che misura l'accordo tra le osservazioni fatte dallo stesso

individuo in almeno due occasioni diverse (Scott et al., 2001). Un'altra importante proprietà degli indicatori è la fattibilità: con questa caratteristica si vuole indicare che l'indicatore che viene utilizzato deve essere facilmente gestito da persone addestrate, deve richiedere un tempo limitato per la sua misurazione e deve essere economicamente fattibile.

4.1 LA SCELTA DEGLI INDICATORI

Il punto di partenza per l'individuazione degli indicatori da inserire nel modello di valutazione del benessere è quello di definire le esigenze degli animali, basandosi generalmente sulle Cinque Libertà (FAWC, 1993). Occorre quindi individuare una lista di indicatori capaci di rilevare il grado di soddisfacimento di tutte le esigenze degli animali (Capdeville e Veissier, 2001), sono questi gli indicatori indiretti. Tuttavia, c'è abbastanza consenso in letteratura sull'idea che si debba valutare il benessere attraverso l'utilizzo combinato di vari tipi di indicatori includendo quelli comportamentali, fisiologici, e sanitari (Fraser, 1995; Webster 1997), oltre a quelli produttivi e riproduttivi (Curtis, 1985). Questi indicatori definiti anche indicatori diretti o *animal-based* possono consentire un'accurata valutazione delle reazioni degli animali al fine di elaborare una misurazione corretta del livello di discomfort dell'animale.

La combinazione dei diversi tipi di indicatori, in grado di valutare i diversi aspetti del benessere, è dettata dalla constatazione che non è infrequente ottenere, con i diversi tipi di indicatori, risultati parzialmente in contrasto fra loro.

La definizione della lista di indicatori capace di riflettere il pieno soddisfacimento delle esigenze degli animali viene effettuata sulla scorta delle informazioni sull'argomento reperibili in letteratura ed altresì dalla esperienza del ricercatore, come indicato da Capdeville e Veissier (2001). Il punto di partenza per una corretta valutazione del benessere deve peraltro riguardare, per i diversi sistemi di allevamento, le principali cause di riduzione del benessere e le loro conseguenze sugli animali, poiché è da queste ultime che scaturiscono i suddetti indicatori. In tal modo si potranno selezionare quegli indicatori diretti più appropriati e che sono maggiormente influenzabili, per cui risulteranno più sensibili nella valutazione del benessere.

Per quanto riguarda la bovina da latte, la diffusione dell'allevamento intensivo ha completamente mutato le condizioni di vita degli animali, creando oggettivi miglioramenti (come ad esempio la stabulazione libera), ma al tempo stesso delle situazioni potenzialmente in grado di ridurre il benessere. Stress di natura fisica (ad esempio alte o basse temperature, mungiture dolorose strutture inadeguate ecc.) o psicologica (ad esempio isolamento, sovraffollamento, interazione sociale ecc.) possono determinare le medesime condizioni pre-patologiche che si avrebbero in presenza di anomalie fisiologiche. Questo rende estremamente difficile dare un giudizio preventivo sulle

conseguenze che i vari fattori di stress possono avere sugli animali (Bertoni, 1994). Ciò rende ragione della necessità di non limitarsi ai punti critici dei sistemi di allevamento in relazione alle “Cinque Libertà”, ma come è stato anticipato da Grandin (1997): “occorre un’accurata valutazione delle reazioni degli animali, una combinazione tra osservazioni comportamentali e misure fisiologiche, al fine di elaborare una misurazione corretta del livello di discomfort dell’animale.” Secondo Waiblinger et al. (2001), gli indicatori di benessere rilevati ai fini di una loro introduzione in un sistema di valutazione di benessere utilizzabile in allevamento nell’ambito degli strumenti di valutazione pratica del benessere, dovrebbero rispondere ai seguenti requisiti:

- devono essere basati su evidenze scientifiche ed essere in grado di individuare i cambiamenti nel tempo;
- devono essere misurabili in allevamenti commerciali in una struttura realistica;
- devono essere connessi a mezzi di supporto decisionali (per adempiere a questo requisito gli indicatori devono fornire informazioni sui rischi potenziali così come sugli attuali problemi di benessere).

Gli indicatori candidati vanno quindi scelti sia tra gli indicatori indiretti relativi al sistema allevamento, sia tra quelli comportamentali e sia tra quelli relativi al suo stato di salute, che sono maggiormente collegati all’ animale in questione.

Non c’è pieno soddisfacimento di questi requisiti, almeno per una parte di indicatori diretti proposti in letteratura. Fra essi vi sono i parametri comportamentali che possono richiedere tempi lunghi. Ad esempio, i test sviluppati appositamente per valutare le difficoltà ad alzarsi degli animali (Sørensen et al., 2001) e le relazioni uomo –animale (Waiblinger, 2001) richiedono tempi relativamente lunghi per osservare un adeguato numero di capi. Tuttavia, questa situazione potrebbe cambiare nel prossimo futuro dal momento che sono disponibili sistemi per il controllo e la registrazione automatica del comportamento dei singoli animali o gruppi di animali (Johnsen et al., 2001). Tali sistemi, previsti nell’ambito della zootecnia di precisione, potranno essere utilizzati anche con queste finalità. La misura dei parametri per lo stato sanitario sembra più agevole, avendo frequentemente la possibilità di accedere ai database sanitari, dove vengono obbligatoriamente registrati i problemi sanitari e le terapie utilizzate per i singoli animali. Tuttavia questi dati, secondo Sørensen et al., 2001 con i quali concordiamo, non sono sufficienti per valutare adeguatamente le condizioni sanitarie degli animali. E’ preferibile quindi effettuare una serie di rilievi nell’ambito di una ispezione su di un numero rappresentativo di animali all’interno della mandria.

In accordo con Sørensen et al. (2001) ed in base a quanto esposto in precedenza si ritiene necessario il rilievo di due tipi di informazioni:

- informazioni riguardanti il sistema e la sua gestione;

- informazioni su come l'animale risponde all'ambiente in cui vive ed a come viene trattato.

Il primo tipo di informazioni è rilevabile attraverso gli indicatori indiretti e si può suddividere in “sistema” ed “applicazione del sistema” (management). Il secondo tipo di informazioni è rilevabile attraverso gli indicatori diretti, che secondo Sørensen et al. (2001), includono gli aspetti comportamentali e lo stato sanitario. A quest'ultimo tipo di informazioni noi aggiungiamo anche le performance produttive e riproduttive, nonché qualche aspetto fisiologico.

Il “sistema” include sia l'”housing” che le aree esterne (Sørensen et al. 2001). E' importante ai fini del benessere perché fornisce indicazioni circa le risorse per gli animali ed anche le limitazioni che ad essi pone. Gli indicatori utilizzabili includono quindi informazioni sulle caratteristiche delle strutture, degli impianti e delle attrezzature disponibili ecc. Per gli animali che vanno all'aperto sono incluse le qualità del pascolo (disponibilità di ombra e ripari, distanza tra pascolo e zona di mungitura, ecc.).

Un sistema di allevamento, tuttavia, può essere applicato in molti modi e queste modalità di applicazione possono influenzare non poco il benessere (Fregonesi e Leaver, 2001). Lo spazio disponibile per gli animali nel ricovero è un tipico esempio della modalità di applicazione del sistema che influenza il benessere; se infatti l'area di riposo è insufficiente, ma soprattutto la lettiera e/o le cuccette non sono correttamente gestite, gli animali saranno a disagio. La modalità di applicazione del sistema viene interpretata in maniera ampia (Sørensen et al. 2001), includendo il management giornaliero (management dell'alimentazione, attenzione all'igiene, ecc.).

Per quanto attiene alla risposta degli animali i parametri comportamentali sono tra gli indicatori diretti di benessere, quelli più sensibili (Veissier et al., 2000). Sfortunatamente esiste il problema dello sviluppo di un sistema di valutazione flessibile basato su indicatori robusti e validi per l'uso in campo (Sørensen et al. 2001). Le osservazioni comportamentali includono vari test standardizzati, ma finalizzati soprattutto alla ricerca, per la misura delle reazioni animale-uomo (test paura-timore), il comportamento per valutare il comfort, come ad esempio la facilità con cui l'animale si alza. Infine sono suggerite alcune osservazioni sulle interazioni sociali fra gli animali (Sørensen et al. 2001).

Per quanto riguarda i dati sullo stato sanitario degli animali, già si è detto che non sempre i trattamenti veterinari forniscono una precisa misura delle malattie. La misura dello stato sanitario si deve focalizzare anche su esami clinici sistematici; ad esempio le lesioni cutanee, le laminiti, le condizioni esterne del corpo e le malattie cliniche.

Relativamente più facili sono i rilievi riguardanti le performance (produzione e qualità del latte, parametri riproduttivi, ecc.). Infine assai diversificata è la situazione per gli aspetti fisiologici la cui rilevazione può essere relativamente semplice (ruminazione, atti respiratori) od estremamente

complessa (battito cardiaco, cortisolo ematico), anche in funzione dei mezzi tecnologici disponibili (temperatura del latte, attivometro, ecc.).

La scelta finale degli indicatori da includere nel modello dipende dall'ambito in cui il modello di valutazione del benessere verrà utilizzato e dagli obiettivi che il modello stesso intende perseguire. (Main et al., 2003). Ad esempio per modelli da utilizzare nell'ambito della legislazione, che hanno il principale compito di valutare se l'allevatore mette in atto le buone pratiche di allevamento, e quindi garantisce condizioni di benessere soddisfacenti ai suoi animali, si potranno includere nel modello indicatori prevalentemente di tipo indiretto. Nei casi in cui il modello venga utilizzato nell'ambito della certificazione, si potranno utilizzare indicatori di tipo diretto o indiretto in funzione degli obiettivi che tale modello intende raggiungere. Infine, quando il modello viene utilizzato nell'ambito dell'assistenza tecnica, è necessario utilizzare un più elevato numero di indicatori, sia di tipo diretto che di tipo indiretto; solo così si può evidenziare gran parte delle cause di riduzione del benessere, quindi proporre gli opportuni rimedi e migliorare così le condizioni di benessere negli allevamenti.

4.2 SVILUPPO DEI MODELLI DI VALUTAZIONE DEL BENESSERE

Per lo sviluppo del modello, le procedure utilizzabili possono essere diverse ed in parte, proprio per le difficoltà che si incontrano nello sviluppo, sono per certi versi criticabili.

In primo luogo occorre selezionare gli indicatori che verranno utilizzati nel modello finale di valutazione del benessere utilizzabile in campo. La metodologia che si suggerisce in questo caso è quella di utilizzare inizialmente il più largo numero di indicatori che sia possibile; successivamente, sulla scorta delle elaborazioni dei dati raccolti, si potrà selezionare un numero più ridotto di indicatori, da utilizzare in campo, al fine di ottenere un modello semplificato di impiego pratico.

Gli approcci che si possono utilizzare per lo sviluppo di un modello di valutazione del benessere adeguato appartengono a due tipologie fondamentali:

- *l'approccio epidemiologico*, principalmente applicato nella ricerca medica per individuare i principali fattori di rischio delle malattie (Noordhuizen et al., 1994);
- *l'approccio basato sulla raccolta di un elevato numero di indicatori potenzialmente in grado di influenzare il benessere (indicatori indiretti) e raccogliere contemporaneamente gli indicatori diretti di benessere in un elevato numero di allevamenti*. L'elaborazione dei dati si può quindi effettuare attraverso l'analisi multivariata per analizzare i dati così raccolti ed individuare le relazioni fra i fattori influenzanti (indicatori indiretti) e gli indicatori diretti di benessere, l'importanza relativa dei singoli fattori influenzanti, nonché le relazioni fra i singoli indicatori di benessere. Questo approccio consente di definire il modello ed i

parametri diretti ed indiretti essenziali da inserire nel modello, con alcune indicazioni sui pesi relativi di ognuno di essi. Le conoscenze attuali sugli effetti dei singoli fattori ambientali possono rappresentare il punto di partenza per la creazione dei modelli statistici di valutazione. L'analisi fattoriale (multivariata) può essere infine di aiuto per raggruppare i fattori influenzanti (indicatori indiretti).

La possibilità di generalizzare il modello risultante deve essere confermata attraverso la sua applicazione ad un nuovo set di dati. Se ad esempio dal modello di elaborazione emergesse che alcune caratteristiche delle cuccette creano problemi ad alzarsi per gli animali, nel modello finale si potrebbero prendere in considerazione solo le caratteristiche delle cuccette, riducendo così il tempo per la rilevazione dei dati. Anche la conoscenza di strette relazioni fra diversi indicatori diretti di benessere può suggerire l'inserimento nel modello di uno solo di questi (quello più facilmente rilevabile ed in modo più accurato) Tuttavia, riteniamo opportuno sottolineare che la selezione degli indicatori dipende molto dall'ambito in cui verrà utilizzato il modello e dagli obiettivi del modello stesso. Nel caso in cui tra gli obiettivi sia inclusa anche l'individuazione delle cause di riduzione del benessere, si ritiene di mantenere comunque un elevato numero di indicatori, assegnando un peso relativo inferiore a quelli che sembrano poco importanti per i diversi aspetti del benessere. Ciò purché questi ultimi possano essere utili per l'individuazione delle cause di riduzione del benessere.

4.3 AGGREGAZIONE DEGLI INDICATORI UTILIZZABILI NEI MODELLI DI VALUTAZIONE DEL BENESERE

E' stato precedentemente detto che il benessere è una variabile multidimensionale e quindi la sua valutazione deve prendere in considerazione i numerosi aspetti del benessere, soprattutto attraverso i diversi tipi di indicatori diretti. Il problema è quindi quello di assegnare i pesi, in termini di relazione con il benessere, relativi alle varie componenti considerate per i diversi aspetti. Infatti, la valutazione delle diverse componenti del benessere porta talvolta a risultati tra loro in contrasto: ad esempio l'allevamento brado consente agli animali di esprimere il proprio repertorio comportamentale, ma accresce i rischi dei parassiti e predatori. Inoltre, i singoli indicatori possono essere più o meno rappresentativi dell'aspetto che "descrivono", sia per il loro numero e sia per l'ampiezza del fenomeno che descrivono.

Per l'assegnazione dei pesi relativi si possono fondamentalmente seguire due diverse modalità: diretta o soggettiva ed indiretta (Scott *et al.*, 2001). Quella diretta o stima soggettiva è basata sulle stime soggettive, da parte di chi sviluppa il modello, dei pesi che bisognerebbe assegnare ad ogni

indicatore. Questo comporta una certa soggettività nell'attribuzione dei pesi relativi: influenzata dagli strumenti (conoscitivi e materiali) di cui dispone il ricercatore. Questa tecnica, secondo Scott *et al.* (2001), non sembra del tutto appropriata per un punteggio composto del benessere.

Nelle tecniche indirette o discriminanti, il peso per ciascun indicatore è derivato da osservazioni sperimentali ed in questo ambito si possono utilizzare due modelli (Scott *et al.*, 2001). Nel primo modello ogni indicatore ha la stessa importanza nei riguardi del benessere e si assegna il peso di 1 ad ognuno di essi. Lo score totale quindi rappresenta la somma degli indicatori osservati. Il secondo modello è quello delle comparazioni a coppie, derivato dalla classica legge di giudizio comparativo di Thurstone (1927), descritto da Scott (2001).

Alla luce di quanto esposto emerge che esistono difficoltà nell'aggregare correttamente i diversi aspetti del benessere in un valore complessivo, si ritiene quindi importante non fornire solo il valore complessivo, ma anche i valori parziali per i vari aspetti del benessere. Tuttavia i motivi principali che suggeriscono di considerare anche i valori per i diversi aspetti del benessere sono altri. Infatti, per evitare che il "bene" compensi il "male", si ritiene importante definire delle soglie minime, oltre che per il giudizio complessivo del benessere, anche per i giudizi relativi ai vari aspetti del benessere ed evitare in tal modo che non vi sia stimolo a ridurre od eliminare le cause di minore benessere.

4.4 ESEMPI DI MODELLI DI VALUTAZIONE DEL BENESSERE IN CAMPO PRESENTI IN EUROPA

In questo scenario appare indispensabile l'elaborazione di criteri chiave atti alla misurazione del benessere animale e delle sue varie dimensioni; ed è proprio a causa di queste considerazioni che sta crescendo l'interesse di sviluppare degli schemi che siano in grado di assicurare la qualità delle produzioni animali e da qui la contemporanea necessità di elaborare degli strumenti di misurazione in grado di dare una reale valutazione dello stato di benessere degli animali allevati; perciò negli ultimi vent'anni sono stati messi a punto diversi sistemi di valutazione del benessere degli animali in produzione zootecnica; tali metodologie variano a seconda dello scopo per cui vengono adottati quali la certificazione del livello di benessere di una singola azienda, il confronto tra diversi sistemi di produzione, per assistere il singolo allevatore nella prevenzione, identificazione e risoluzione di eventuali problematiche legate al benessere in azienda.

Un primo esempio di modello di valutazione del benessere animale è l' "Animal Needs Index" (Bartussek, 1999). Questo sistema è basato su di un sistema di punteggiatura e permette alle aziende che soddisfano determinati standards, di certificare le condizioni di benessere dei propri animali. Il sistema è basato esclusivamente sui parametri indiretti e considera quattro importanti

componenti dell'allevamento: possibilità di movimento e di contatti sociali, condizioni delle pavimentazioni, microclima e condotta da parte degli addetti. Gli aspetti selezionati riguardanti sia l'ambiente di allevamento sia il management vengono punteggiati attraverso sopralluoghi in azienda e i punteggi derivati vengono riassunti nel punteggio finale. Più è alto il punteggio, maggiore sarà il livello di benessere di quella determinata azienda. Il sistema, essendo basato esclusivamente su parametri indiretti, non valuta l'effettivo benessere ma verifica se le condizioni di allevamento sono rispettose del benessere animale, tuttavia non necessariamente c'è maggiore benessere quando le condizioni del benessere sono più rispettose dell'ideale di benessere e viceversa. Il vantaggio di questa tipologia di sistemi è che sono facilmente attuabili, ripetibili e, fornendo un punteggio finale, rendono possibile il confronto tra diverse aziende. I possibili svantaggi sono che la valutazione del benessere, attribuendo un punteggio complessivo non rende possibile l'identificazione degli specifici problemi legati al benessere; inoltre si fonda quasi completamente solo sulle misurazioni dell'ambiente di allevamento e sulle informazioni relative al management.

Un secondo esempio è rappresentato dal sistema francese di valutazione del benessere messo a punto da Capdeville e Veissier (2001) e applicato negli allevamenti di bovine da latte.

Il punto di partenza per l'elaborazione di questo modello è stato quello di definire delle cinque libertà; a cui sono stati attribuiti 16 bisogni fondamentali, come è illustrato nella Tabella sottostante:

Libertà	Bisogni fondamentali
1 Libertà dalla fame e dalla sete	Assenza di fame, di sete e malnutrizione
2 Libertà dal discomfort	Assenza di stress fisico e climatico
3 Libertà dal dolore, dalle ferite, dalle malattie	Assenza di malattia e di ferite
4 Libertà di esprimere il comportamento normale	Espressione del normale comportamento alimentare, del movimento, del comportamento di riposo, del comportamento sociale, del comportamento sessuale, del comportamento materno
5 Libertà dalla paura e dal distress	Assenza di eventi che possano arrecare spavento all'animale, possibilità di fuga, buon contatto con l'uomo

Successivamente sono stati individuati gli indicatori utilizzati per la valutazione del benessere. Nel modello sono stati quindi inclusi 49 indicatori relativi allo stato di salute dell'animale (in questo caso sono stati valutati: la presenza di mastiti cliniche, zoppie, ritenzioni di placenta, numero di vitelli nati morti, numero di animali abbattuti e lesioni, in accordo con quanto riportato da Vallet (1996) e al suo comportamento (per questa categoria di indicatori sono stati considerati: vari aspetti relativi al movimento, posizione nella cuccetta, interazioni sociali con gli altri animale e con l'uomo). Per ciascun indicatore sono state valutate le conseguenze di ciascuna modalità di

soddisfamento dei bisogni precedentemente descritti. La valutazione è derivata dai valori essenziali dei modelli che sono stati espressi su una scala di valori con quattro livelli: A, B, C, D.

Secondo questo metodo il livello di benessere aziendale viene espresso considerando la seguente scala: A (eccellente), B (sufficiente), C (insufficiente) e D (inaccettabile). Successivamente i giudizi sui parametri appartenenti alla stessa libertà vengono raggruppati, per fornire un unico giudizio relativo a quella libertà considerata. Il giudizio finale sul benessere a livello aziendale risulta quindi composto dai cinque punteggi relativi alle Cinque libertà, con il vantaggio quindi di poter individuare dove eventualmente la situazione è problematica. L'altro vantaggio di questo sistema è che vengono presi prevalentemente in considerazione i parametri diretti sugli animali. La maggiore difficoltà sta nell'attribuire il punteggio esatto e il giusto peso ai diversi parametri per poter fornire un'interpretazione corretta al fine di giungere ad un giudizio che rispecchi il più possibile la realtà.

Altri esempi di modelli di valutazione del benessere animale, basati su di un sistema di punteggiatura, applicabile in azienda sono quelli elaborati sia in Austria (TGI 35L) (Bartussek, 2001) che in Germania (TGI200) (Sundrum et al., 1994); entrambi partono dal "Tiergerechtheitsindex"(TGI), modello di valutazione del benessere animale basato su indicatori diretti sviluppato in Austria negli anni 80.

Entrambi i sistemi valutano l'impatto dei diversi tipi di stabulazione sul benessere animale, riferendosi esclusivamente agli allevamenti bovini, suini e di galline ovaiole. Tali metodi pervengono al *welfare score* di un allevamento attraverso la somma dei singoli punteggi attribuiti ai vari parametri di carattere ambientale e gestionale, ovviamente tanto maggiore sarà lo score e tanto maggiore sarà il livello di benessere degli animali.

Quindi questi sistemi di valutazione si basano quasi esclusivamente sui parametri di tipo ambientale, considerando solo pochi *animal - based parameters*.

La rilevazione dei dati viene eseguita tramite un team di esperti e sulla scorta di tale rilevazione verrà elaborato il total score di ogni singolo allevamento. I due metodi sono impostati in modo tale da compensare i punteggi ottenuti nelle varie aree di un allevamento, ossia quando lo score di un determinato settore scende al di sotto di un minimo prestabilito, questo verrà compensato a discapito di un'area che ha ricevuto un punteggio elevato. In generale tali metodi sono altamente applicabili e ripetibili (Amon et al. 2001).

Il TGI 35L era stato sviluppato come un metodo di certificazione del benessere animale, invece oggi viene utilizzato in Austria nei controlli per l'agricoltura biologica e nella realizzazione di una legislazione sul benessere animale in due province federali dell' Austria.

Nel TGI 35L vengono punteggiati cinque parametri di stabulazione e management: possibilità di movimento, interazioni sociali, tipologia di pavimentazione, clima e cure dell'allevatore.

Nel modello mancano parametri inerenti all'alimentazione, in quanto si considera antieconomico per l'allevatore stesso non alimentare correttamente i propri animali. Inoltre tipologie di stabulazione eccessivamente restrittive, come l'allevamento delle ovaiole in gabbia, non vengono analizzate; si parte infatti, da uno standard minimo, definito come spazio minimo richiesto. I parametri considerati sono quasi esclusivamente ambientali e ad ognuno di esso è attribuito un punteggio che va da 0,5 a 3; combinando i diversi punteggi si arriva ad un totale massimo di 45,5 punti (in una vecchia versione del modello, denominata TGI 35, il punteggio massimo era 35 e quando fu portato a 45,5 al nome si aggiunse la "L", che stava ad indicare "long version").

All'interno dei 45,5 punti sono distinte sei categorie di benessere:

- a) con punteggi inferiori a 11 si un livello di benessere non adeguato;
- b) tra 11 e 15 è scarsamente adeguato;
- c) tra 16 e 20 è poco adeguato;
- d) tra 21 e 24 è relativamente adeguato;
- e) tra 25 e 28 è adeguato;
- f) tra 29 e 45,5 è molto adeguato.

Mentre il TGI 200 era stato sviluppato come metodo di valutazione, che permettesse anche un confronto tra i welfare score di diversi allevamenti analizzati. Questo modello punteggia sette diversi aspetti inerenti alla stabulazione ed al management: "*locomotion*", alimentazione, interazioni sociali, idoneità delle aree di riposo, comfort, igiene, attenzione dell'allevatore.

Per la valutazione del benessere negli allevamenti suini si prendono in considerazione anche parametri relativi alla defecazione e minzione, invece per le galline ovaiole si valuta anche l'idoneità dei nidi. Ad ogni parametro viene attribuito un punteggio da 1 a 7 (Sundrum et al., 1994). Il massimo punteggio è predefinito in funzione del tipo di stabulazione; per la stabulazione libera con accesso alla mangiatoia si può arrivare anche a 200, che è il massimo punteggio attribuibile con questo sistema. Alcune tipologie di allevamento, come le scrofe in gabbia e le ovaiole in batteria, non vengono affatto esaminate.

Un altro esempio di metodo per la valutazione del benessere animale è quello elaborato da Bracke et al. (1999). Questo si basa sul concetto che per la valutazione del benessere animale è necessario avere conoscenza dei bisogni biologici degli animali; considera inoltre il benessere come una tematica complessa costituita da numerose variabili (comportamento, fisiologia, produttività e salute e parametri ambientali) a cui viene attribuito un punteggio che andrà poi a comporre quello di valutazione del benessere complessivo. Sulla base di indicazioni bibliografiche, riguardanti questa tematica viene sviluppato un algoritmo in cui si determina la relazione tra parametri ambientali e

fabbisogni animali. Tale algoritmo presenta la base del modello di valutazione del benessere in differenti tipologie di allevamento.

Tra i molteplici esempi di modelli di valutazione del benessere, può essere ricordato anche quello messo a punto dall'Istituto Danese di Scienze Agrarie (DIAS). Questo modello è un tipico esempio di valutazione del benessere animale a post hoc ed è basato sulla concezione etica dell'allevamento del bestiame (Sørensen et al., 2001). Questo sistema si rifà alla definizione di benessere animale enunciata da Simonsen (1996), che si focalizza sulle esperienze positive e negative degli animali e rappresenta un ausilio per i singoli allevatori nelle loro decisioni identificando o prevedendo problematiche riguardanti il benessere. Un singolo punteggio sarebbe insufficiente per fornire un adeguato supporto, a tale scopo sono necessari sistemi in grado di individuare in ogni singolo allevamento le eventuali carenze in termini di benessere e le possibili soluzioni. Per tale motivo il sistema in questione integra informazioni sul comportamento e lo stato di salute degli animali con rilievi sulle strutture e sul management. Tuttavia il sistema presenta degli svantaggi quali il notevole dispendio di tempo e di denaro, nonché la necessità di personale esperto che possa interpretare correttamente i risultati.

Va inoltre ricordato un modello basato sull' "*ethical account for animal husbandry*": tale metodo riportato in questo progetto mirava ad ottenere delle informazioni dettagliate sullo stato dell'allevamento e, queste messe a disposizione dell'allevatore, avrebbero dovuto aiutarlo a migliorare il benessere dei propri animali. La valutazione si basava su quattro parametri: la tipologia di stabulazione ed il management, come indicatori indiretti di benessere; dati sul comportamento degli animali e sulla loro salute; quali indicatori diretti del benessere.

I parametri ambientali e manageriali venivano rilevati da un gruppo di tecnici a seguito della visita aziendale; mentre quelli comportamentali grazie all'esecuzione su campioni di animali di test specifici atti a valutare la paura suscitata dall'uomo negli animali. In aggiunta a queste informazioni, venivano raccolte anche quelle derivanti sia dai controlli sanitari eseguiti su tutta la mandria dal veterinario quattro volte all'anno che dagli interventi routinari.

La valutazione del livello di benessere veniva presentata all'allevatore in un report annuale costituito dalle singole rilevazioni e da un resoconto globale sullo stato di benessere dell'allevamento. Contestualmente l'allevatore veniva informato delle variazioni nel livello di benessere rispetto all'anno precedente e si suggerivano le strategie per migliorare la situazione attuale. Questo metodo non consente un confronto tra vari livelli di benessere registrati in diverse aziende, inoltre non certifica il livello di benessere dell'allevamento.

4.5 IL MODELLO SDIB (Sistema Diagnostico Integrato Benessere)

Alla luce di quanto precedentemente illustrato, l'Istituto di Zootecnica di Piacenza ha da tempo in corso la messa a punto di un modello di valutazione del benessere negli allevamenti di lattifere. Esso deriva dalla progressiva differenziazione del Sistema Diagnostico Integrato (Bertoni et al., 1999) per renderlo sempre più specifico per la valutazione del benessere.

Tale modello si basa su di un approccio multidisciplinare e prende in considerazione numerosi indicatori sia di tipo diretto che di tipo indiretto, poiché è generalmente accettato che entrambe queste serie di indicatori sono importanti indici di benessere animale e che il miglior modo per valutare correttamente il benessere animale è ottenuto quando i parametri di entrambe le serie sono usati in combinazione come è suggerito da Bertoni et al. (1999) e Sørensen et al. (2001).

Gli indicatori indiretti usati nel modello SDIB (Sistema Diagnostico Integrato Benessere) sono stati divisi in due cluster:

- il *cluster allevamento* comprende tutti gli indicatori che consentono di valutare l'ambiente in cui l'animale vive: ambiente di allevamento; gestione dei ricoveri; degli impianti presenti nella stalla; gestione dei gruppi di animali;
- il *cluster alimentazione* comprende tutti gli indicatori utili a caratterizzare la qualità e la sicurezza degli alimenti che vengono utilizzati per la formulazione delle diete nelle stalle di bovine da latte, la quantità di alimento ingerita giornalmente e al momento del parto, la disponibilità di acqua, la composizione della dieta e il soddisfacimento di specifici fabbisogni di nutrienti nel periodo di asciutta, fase iniziale e finale di lattazione.

Gli indicatori diretti sono invece compresi in un terzo cluster: *cluster animale*. In esso sono compresi tutti gli indicatori che considerano le conseguenze dei precedenti indicatori indiretti e che possono essere valutati in accordo con alcuni indici comportamentali, fisiologici, di performance e dello stato di salute.

Ciascun cluster viene poi suddiviso in componenti e ciascuna componente è caratterizzata dai singoli indicatori relativi a quel determinato aspetto valutato.

Nello sviluppo del modello SDIB, molto importante è stata la scelta degli indicatori fatta in modo da soddisfare i requisiti di validità, praticabilità e attendibilità. E' altrettanto importante che tali indicatori diretti siano "direttamente" espressione di come l'animale risponde senza alcuna mediazione; in particolare la rilevazione deve essere diretta per non incorrere nelle inevitabili "interpretazioni" da parte dell'allevatore e/o del personale di stalla (compreso il veterinario).

Le schede utilizzate per l'applicazione del modello SDIB in allevamento che comprendono sia gli indicatori diretti che quelli indiretti devono essere compilate dall'osservatore. Successivamente la quantizzazione e la categorizzazione del grado di benessere ottenuta dall'animale può derivare

dall'applicazione del modello che utilizza diversi metodi di valutazione (Scott et al., 2001) in accordo con la tipologia di dati raccolti attraverso l'utilizzo di ciascun indicatore incluso nel modello.

Una misurazione mediante classi gerarchiche o ordinate è stata utilizzata per gli indicatori dove le risposte sono gerarchizzate in categorie quali: buono, migliore, ottimo oppure moderato, lieve e grave. Tre o cinque differenti livelli, includendo anche quelli intermedi, sono stati utilizzati in relazione alla tipologia dei dati raccolti con questo tipo di indicatori. Nel caso invece di indicatori caratterizzati da una variabilità continua, le osservazioni vengono raggruppate in classi che hanno solitamente uguale ampiezza.

Per ottenere quindi una valutazione oggettiva delle varie condizioni dell'animale (es. stato nutrizionale, pulizia, punta dei capezzoli, feci, andatura ecc.) è stato necessario adottare sistemi di punteggio reperibili in letteratura. Naturalmente il punteggio specifico deve esprimere quanto sia prossima all'ideale, quindi il massimo del punteggio previsto, la situazione rilevata in quell'allevamento, pertanto per quel determinato indicatore, il punteggio sarà tanto più basso quanto più ci si discosta dall'ideale e la sua conversione in valore percentuale (sempre rispetto all'ideale), facilita l'immediata percezione della situazione dell'allevamento. I punteggi ottenuti per vari gruppi di indicatori o parametri vengono aggregati in maniera ponderata per l'ottenimento di un punteggio del benessere complessivo della mandria.

I dati raccolti per ciascun indicatore sono espressi in percentuale del loro valore ottimale, comparando la situazione aziendale ottimale di ciascun indicatore con valori standard ben stabiliti. Il valore 100% è assegnato quando la situazione aziendale è ritenuta ottimale; il valore 60% quando la situazione è considerata appena sufficiente. Così i valori dei punteggi esprimono i dati come percentuale del migliore benessere e aumentano la legittimità del risultato.

Uno dei principali problemi è il criterio con cui aggregare i punteggi ottenuti riguardanti i diversi aspetti del benessere; è infatti di fondamentale importanza dare loro un "peso" in accordo con la più probabile relazione con il benessere. In altre parole, comune ad ogni modello di valutazione del benessere, ci sono due necessità: la prima è quella di raccogliere molti dati durante brevi visite aziendali; e la seconda di integrare questi dati in un giudizio di valutazione del benessere bilanciato (Wemelsfelder and Lawrence, 2001).

Tuttavia come sottolineato da Fraser (1995), il benessere è un concetto multidisciplinare che comprende la realizzazione delle Cinque Libertà (FAWC, 1993); per questo motivo può essere descritto in maniera quantitativa in una scala comune con alcune difficoltà. È stato sostenuto che non è possibile valutare il benessere complessivo (Fraser et al., 1997) poiché non si può "pesare" insieme differenti aspetti del benessere. Tuttavia questa difficoltà non significa impossibilità. Infatti

le varie metodologie per il monitoraggio aziendale hanno proposto diversi protocolli per pesare ed aggregare in un punteggio globale le varie misure ed informazioni raccolte (Bracke et al., 1999; Rousing et al., 2001). Questi protocolli tendono ad essere basati su di un insieme di risultati della ricerca, sulle opinioni degli esperti del settore, su considerazioni etiche e senso comune, con la definizione di criteri per aggregare le misure acquisite nel punteggio finale di valutazione del benessere. Pertanto nel modello SDIB, l'aggregazione dei punteggi ottenuta per ciascun aspetto degli indicatori del benessere è stata ottenuta applicando un fattore per "pesare" ciascun punteggio applicato agli indicatori di benessere per calcolare il punteggio complessivo. I fattori utilizzati sono stati definiti usando tecniche per la stima diretta o soggettiva come suggerito da Scott et al. (2001), basate sulla loro migliore stima soggettiva dei "pesi" che dovrebbero essere attribuiti all'indicatore, in accordo con la loro accuratezza, validità e con le relazioni che si suppone si creino con il benessere.

Il modello SDIB è quindi una metodologia basata su di un approccio multidisciplinare e utilizzata per la valutazione del benessere animale che consente di ottenere un valore complessivo del benessere animale.

Il punteggio massimo è pari a 100 che nella attuale ipotesi è suddiviso in tre parti: 30 per il cluster allevamento, 30 per quello relativo all'alimentazione e 40 per quello animale. L'ulteriore divisione di ciascun cluster nelle specifiche componenti, aspetti e indicatori, con i loro pesi relativi, è mostrata nelle Tabelle 1, 2 e 3 dell'Appendice. Nel report del modello SDIB sono mostrati insieme i punteggi complessivi, i punteggi di ciascun cluster e le loro specifiche componenti, aspetti e indicatori. Questi risultati, sono espressi entrambi come valori "pesati" e come percentuale del loro valore ottimale. I punti di ciascun cluster vengono ripartiti nelle varie componenti ed in ciascun aspetto sulla base presunta del loro peso-tenuto anche conto dell'attendibilità consentita dai metodi disponibili per la loro rilevazione- nell'influire sul grado di benessere degli animali.

Per ottenere il punteggio di uno specifico allevamento si deve innanzitutto attribuire un valore ai singoli indicatori e quindi agli aspetti che lo compongono, valore che sarà relativo a quello "ottimale" e stabilito in funzione del peso ad esso attribuito. La somma dei punti viene fatta separatamente per le componenti e poi per i sottosistemi o cluster (animale, allevamento e alimentazione), in modo da avere una immediata percezione anche grazie al riferimento percentuale dei punti di forza e di debolezza dell'allevamento in termini di garanzia del benessere.

Il *cluster allevamento* comprende gli indicatori relativi al sistema (22) (ricoveri, impianti e attrezzature) e la sua gestione (13). I rilievi relativi al "sistema" riguardano:

- il tipo di ricovero per gli animali nelle diverse fasi fisiologiche, diverso per gli animali legati o liberi, che andrà valutato in funzione del fatto che si possa o meno ritenere idoneo ad

assicurare le migliori condizioni di comfort ed igienico sanitarie agli animali. I rilievi sulle strutture sono mirati a valutare: l' idoneità in termini di cubatura, coibentazione, ventilazione naturale, idoneità della zona di riposo (nel caso delle cuccette attraverso le misure delle dimensioni, confrontando i valori ottimali con le dimensioni standard, proposte da McFarland (2003) e le indicazioni di Veissier et al. (2004), delle pavimentazioni, accessibilità al paddock, disposizione degli abbeveratoi ecc.;

- lo spazio a disposizione per ciascun animale nella zona di riposo e nella zona di alimentazione;
- tra gli indicatori delle condizioni microclimatiche sono valutati soprattutto quelli che garantiscono una maggiore adeguatezza della stalla in vista di un ottimale status igienico-sanitario e che valutano il rischio dello stress da caldo; la presenza e l' adeguatezza dei sistemi di raffrescamento per il periodo estivo (tipologia di sistema utilizzata, numero di ventole per animale, la disposizione di ogni singola ventola, il numero di gocciolatori/spruzzatori per ventola);
- l' idoneità dell' impianto di mungitura (dimensioni in rapporto al numero di capi per gruppo ed al numero di gruppi, l' efficienza in rapporto al numero di capi ed al numero di persone addette).

Quelli relativi alla “gestione” comprendono:

- la pulizia delle diverse aree in cui può essere suddiviso l' allevamento;
- presenza o meno di fattori traumatizzanti;
- il funzionamento e la manutenzione delle diverse attrezzature (mungitrice, asporto deiezioni, impianti climatizzazione, drenaggio-raccolta e smaltimento delle deiezioni), soprattutto con riferimento alla regolarità e agli intervalli di manutenzione;
- la modalità di gestione dei gruppi di animali in funzione della fase fisiologica e della produzione, ma anche del numero complessivo dei capi per gruppo. Le dimensioni di ciascun gruppo vengono considerate insieme alla movimentazione degli animali da un gruppo all' altro poiché il ricostituire i gruppi può fornire comportamenti agonistici e disturbare la loro normale routine comportamentale (Grant and Albright, 2001). con riduzione del benessere (Bouissou et al., 2001), pertanto la raccolta di questi dati può essere una misura indiretta del comportamento sociale.

Nel *cluster alimentazione* si valutano gli alimenti (10 indicatori) e le razioni (5 indicatori). Per gli alimenti, i rilievi più importanti riguardano:

- la modalità di conservazione, poiché non v' è dubbio che una premessa importante della loro qualità è la disponibilità di adeguate strutture; altrettanto importante è che, specie per i fieni,

ma anche per eventuali materie prime, si possano distinguere partite diverse sia per la tracciabilità e sia per l'impiego per gruppi di animali più o meno esigenti: Infine non sono da trascurare le dimensioni delle strutture in cui vengono conservati i foraggi, che devono essere proporzionate al numero di animali allevati;

- la qualità degli alimenti, con particolare riferimento alle loro caratteristiche igienico-sanitarie ma anche con riferimento alle caratteristiche nutrizionali in relazione alla tipologia di alimento utilizzato. La qualità dei foraggi è valutata utilizzando alcuni metodi proposti in letteratura. La valutazione dei fieni è formulata in accordo con il metodo proposto da Caddel and Allen (1993) e considera i seguenti aspetti: ricchezza in foglie (punteggio massimo attribuito 30), maturità alla raccolta (punteggio massimo attribuito 30), odore (punteggio massimo attribuito 10), colore (punteggio massimo attribuito 10), morbidezza (punteggio massimo attribuito 10), purezza (punteggio massimo attribuito 5), condizioni dei balloni (punteggio massimo attribuito 5), la presenza di muffe (punteggio massimo attribuito 20), anomalie fermentative (punteggio massimo attribuito 20), infestanti (punteggio massimo attribuito 5), presenza di terra o polverosità (punteggio massimo attribuito 20), eccessiva umidità o secchezza (punteggio massimo attribuito 10). La somma dei punteggi negativi quando superiore a 35 (come valore assoluto) viene posta pari a -35. La valutazione finale dei fieni è quindi largamente influenzata dalla loro sicurezza, considerata un prerequisito della dieta che può influenzare la salute e il benessere. La valutazione dell'insilato di mais viene invece eseguita utilizzando il metodo proposto da Bates (1998). Essa prevede l'analisi delle seguenti caratteristiche: contenuto in granella (punteggio massimo attribuito 40), il colore (punteggio massimo attribuito 12), l'odore (punteggio massimo attribuito 28), l'umidità (punteggio massimo attribuito 10) e la trinciatura (precisione e lunghezza) (punteggio massimo attribuito 10).

Relativamente alle razioni sono stati considerati:

- la gestione degli alimenti e la modalità di distribuzione. Nel caso in cui si utilizza la tecnica tradizionale di distribuzione degli alimenti si prendono in esame la sequenza ed i tempi di distribuzione degli alimenti oltre che alla quantità di concentrato somministrata in rapporto al numero di distribuzioni giornaliere;
- le razioni adottate nel periodo pre-parto, valutandone in particolare l'ingestione di sostanza secca, la copertura dei fabbisogni di energia e proteine durante l'asciutta e l'idoneità della razione per la preparazione dell'animale al parto in termini di estensione temporale e di sua composizione;

- le razioni adottate durante la lattazione con particolare riguardo all'entità della sostanza secca ingerita in alcune fasi critiche (es. 50, 150 e 250 giorni di lattazione), anche se ciò è in relazione con la ripartizione in gruppi. Assai importante è poi l'esame di queste razioni per i loro contenuti di amidi/fibre (specialmente l' NDF) e di frazioni proteiche poiché da essi dipendono in larga misura le funzioni digestive. Meno rilevante, anche se non trascurabile, è invece la copertura teorica dei fabbisogni, per il noto variare nelle diverse fasi, anche in relazione ai processi di mobilitazione delle riserve corporee (che saranno monitorate con il BCS).

Come si può ben comprendere, i giudizi espressi per il cluster alimentazione, ed in rapporto ai noti canoni di gestione di alimenti e razioni, può consentire l'acquisizione di rilevanti elementi di giudizio circa uno dei fattori più importanti nel garantire salute e qualità di vita degli animali, dunque il benessere. Anche in questo caso l'esame congiunto di questi dati con la risposta degli animali può essere di grande aiuto nell'individuare alcune delle cause di riduzione del benessere. Infatti anche per questo cluster sono evidenti ed ovvie le conseguenze sugli animali, alcune delle quali sono contemplate nel cluster animale (BCS, funzionalità digestiva, quantità e qualità del latte ecc.), nondimeno evidente è tuttavia il fatto che il suo approfondimento consente l'individuazione delle cause specifiche, oltre a dare l'immediata percezione di una delle Cinque Libertà: dalla fame, dalla sete e dalla malnutrizione. Infine esso consente di ridurre il ricorso ad indici "costosi" quali le analisi ematiche ed eventualmente di facilitarne l'interpretazione (Bertoni et al., 1999).

Il cluster animale include gli indicatori diretti e ad esso viene attribuito un peso maggiore (40 punti su 100) in virtù del fatto che tali indicatori dovrebbero valutare il reale benessere degli animali, ma anche perché i rilievi effettuati in questo ambito risentono degli effetti degli altri due cluster. Poiché i rilievi individuali non possono essere eseguiti su tutti i capi, il controllo deve riguardare 6-10 animali (in funzione della dimensione della mandria) per ognuna delle fasi del ciclo produttivo: asciutta, inizio e fase avanzata della lattazione. Gli animali debbono essere scelti in maniera casuale, preferibilmente da un elenco in cui vengono semplicemente indicati i giorni dal parto ed il numero di parti, escludendo gli animali in prossimità del parto. Per ottenere un valore significativo è stato considerato un numero rappresentativo di animali campione e tutti gli animali sono stati valutati in uno specifico momento fisiologico (asciutta, fresche e lattazione avanzata).

Il cluster animale considera complessivamente 30 indicatori.

Con riferimento alla prima componente del cluster animale, stato salute e riproduzione (15 indicatori) gli aspetti presi in considerazione sono:

- le condizioni nutrizionali che si valutano con il cosiddetto Body Condition Score (BCS, ADAS, 1986), ma anche rilevando l'aspetto generale con riferimento al mantello, alla

presenza di ferite (Weary and Taszkun, 2000; Dawkins, 1980) da fatti traumatici, ascessi, ecc. Ci sono tre momenti critici in cui è importante fare questa valutazione: fine gravidanza (asciutta), inizio lattazione (3° mese) e lattazione avanzata;

- la funzionalità del digerente che si avvale del giudizio sull'attività ruminativa delle bovine in lattazione valutata mediante l'esecuzione del *Rumination Score* e sulla consistenza delle feci valutata mediante l'utilizzo del *Faeces Score* (Skidmore et al., 1996). Tale valutazione può essere eventualmente completata attraverso un ulteriore giudizio basato sulla presenza di materiale grossolano e sulla eventuale presenza di muco nelle feci;
- la mammella con particolare riguardo alle caratteristiche della punta del capezzolo (valutazione eventuali fenomeni di ipercheratosi); tale valutazione viene eseguita mediante l'esecuzione del *Teat Score* (Neijenhuis et al., 2000; Mein et al., 2001). Inoltre viene valutata la presenza di mastiti cliniche e traumi. Tale valutazione pesa per un 70% sul punteggio totale riservato alla mammella; per il restante 30%, la valutazione della mammella è completata con il contenuto delle cellule somatiche presenti nel latte di massa;
- per arti e piedi ci si avvale del cosiddetto *Foot Score* fondato sull'appoggio dei quattro piedi più o meno perfetto (sino al non appoggiare per nulla un arto). Questo tipo di valutazione si riferisce a problemi traumatici od infiammatori endogeni del piede, mentre utile può essere anche il cosiddetto *Trimming Score* che valuta la regolarità dell'appoggio in relazione al consumo spontaneo o al pareggio degli unghioni. Se possibile, sarebbe utile eseguire anche il *Locomotion Score* (Sprecher, 1997) che valuta tutti questi aspetti in relazione a come l'animale si pone in stazione o cammino su "terreno" piano (linea dorsale rettilinea od arcuata); importante ai fini della valutazione è anche la presenza di ferite, abrasioni, gonfiori ecc. a garretti e ginocchi.
- l'efficienza riproduttiva è basata sul calcolo di un indice complesso di fertilità che tiene conto della percentuale di concepimenti alla prima inseminazione, del numero di inseminazioni necessarie per ottenere una gravidanza, dell'intervallo parto-concepimento, della quota di rimonta. Tali parametri vengono tutti aggregati nel calcolo di un indice complesso, *Fertility Status Index* (Esselmont and Eddy, 1977). Sempre per l'aspetto riproduzione si prende anche in esame la presenza degli aborti o della mortalità perinatale;
- per quanto riguarda l'aspetto malattie si prendono in esame solamente le malattie oggettivamente meglio osservabili dall'allevatore: la ritenzione di placenta, la dislocazione dell'abomaso e il collasso puerperale.

La seconda componente, produzione (3 indicatori), gli aspetti presi in considerazione sono:

- la quantità di latte prodotta, che si ottiene raccogliendo i dati mensili del latte consegnato nei 12 mesi precedenti con la stima della produzione annuale media per capo. Il punteggio viene poi elaborato confrontando i valori stimati con quelli medi di razza riportati dall'AIA, tenendo conto della proporzione fra primipare e pluripare presenti in allevamento;
- la composizione di latte in grasso e proteine pure relativa ai 12 mesi antecedenti. Anche in questo caso il punteggio viene elaborato confrontando i dati raccolti con i valori medi di razza riportati dall'AIA.

Infine la terza componente del cluster animale riguarda il comportamento delle bovine; questa risulta composta da 12 indicatori e gli aspetti che vengono valutati riguardano:

- l'interazione animale-uomo con riferimento agli estranei (es. il rilevatore) e al personale di stalla. Tale valutazione viene eseguita mediante l'applicazione di test specifici; questi hanno la finalità di valutare il livello di paura dell'animale attraverso l'osservazione del comportamento di fuga o di avvicinamento verso una persona in condizioni standard (Hemsworth & Coleman, 1998). Le relazioni uomo –animale sono un importante fattore quando si valuta il benessere animale in allevamento: animali intimoriti rifiutano contatti ricorrenti con le persone, mostrando un rapporto uomo animale piuttosto teso. Si suppone che animali che mostrano questo tipo di comportamento sono spesso sottoposti a trattamenti piuttosto cruenti perché reagiscono in modo non appropriato alle normali procedure di governo. Il risultato si traduce in una complicata e prolungata relazione uomo animale, che alcuni studi hanno dimostrato essere causa anche di una riduzione nella quantità di latte prodotto (Rushen et al., 1998). Già si è detto che gli indicatori comportamentali sono considerati i più sensibili, tra gli indici della risposta degli animali (Veissier et al., 1999). Tuttavia ci sono alcune difficoltà nel caso in cui si vogliono includere questa tipologia di indicatori (specie quelli di esecuzione complessa) in un modello di valutazione di benessere animale a livello aziendale. Infatti solo un piccolo numero di misurazioni possono essere ottenute e queste devono essere ottenute considerando un periodo di osservazione breve (Waiblinger et al., 2001); infine, l'interpretazione del comportamento normale può essere anche complicato negli animali domestici in quanto la selezione ha causato cambiamenti nel loro comportamento (Price, 1984). Ciò non toglie che alcuni indicatori comportamentali possono essere utilizzati. Sørensen et al., (2001) hanno suggerito test standardizzati sulla paura per misurare la relazione tra l'animale e l'uomo, il comfort *behaviour*, la difficoltà ad alzarsi degli animali e alcuni gradi di osservazione del comportamento sociale;
- l'interazione animale ambiente ricorrendo all'esame di come sono utilizzate le aree per il riposo. Per valutare questo aspetto si considerano tutti gli animali correttamente coricati solo

in tale area e quelli coricati nelle corsie o nei corridoi; inoltre se gli animali in piedi sono soltanto quelli in movimento o nelle aree alimentazione-passaggi. Importante è pure la totale (o parziale) utilizzazione delle specifiche aree in rapporto al momento della giornata;

- la presenza di comportamenti positivi quali il *grooming* (specie fra individui diversi e senza eccessi) o viceversa quelli negativi quali le stereotipie (leccare attrezzature o urine, movimenti lingua, abnorme consumo di sali ecc.).

4.6 MODELLI DI VALIDAZIONE UTILIZZATI PER LA VALUTAZIONE DEL BENESSERE ANIMALE NELL'AMBITO DELLA RICERCA SCIENTIFICA

Nella ricerca sul benessere animale notevoli sforzi sono stati fatti per identificare delle misure di welfare e testarne la loro attendibilità. La ripetibilità di una misurazione si ottiene quando la rilevazione effettuata nelle stesse condizioni della precedente, seppur da un operatore diverso, fornisce lo stesso risultato; comunque una buona ripetibilità non basta per attestare la bontà di un indicatore di benessere.

La validazione è una prova, per quanto possibile inoppugnabile, della precisione con la quale una misura viene rilevata, invece l'attendibilità esprime lo scarto esistente tra due misurazioni dello stesso campione (McDowell & Newell, 1987; Thursfield, 1995). Un metodo può essere molto attendibile ed allo stesso tempo poco valido, può avere un'alta validità a livello di gruppo e poca a livello individuale; un modello valido a livello individuale, a causa della mancanza di una scala appropriata, potrebbe non permettere la comparazione tra i dati ottenuti in aziende diverse. Quindi è necessario aver ben chiaro lo scopo del modello di valutazione per poterne giudicare la validità. La presenza di diversi scopi nell'ambito della valutazione di benessere (Johnsen et al., 2001), impone la scelta di uno specifico modello in virtù dell'utilizzo che se ne farà. In funzione del contesto entro cui viene utilizzato il modello e degli obiettivi che si vogliono conseguire, la validazione andrà effettuata in maniera diversa (Alban et al., 2001). Ad esempio, nel caso del modello per verificare la corretta applicazione delle buone pratiche di allevamento, la validazione potrà essere relativamente semplice; nel caso in cui invece il modello debba valutare il reale benessere e contemporaneamente individuare le cause di una sua riduzione, la validazione sarà molto più complessa.

Per validare un modello per la valutazione del benessere degli animali a livello di allevamento è importante specificare l'obiettivo e il grado di praticabilità richiesto; infatti, non ha senso chiedere semplicemente se un modello è valido. Un modello che si basa su un numero limitato di misurazioni può, per esempio, essere utile per dare una buona stima del livello medio di benessere in uno specifico sistema di produzione, ma può essere molto adatto in particolare quando un

allevatore ha bisogno di trovare modi per migliorare il benessere degli animali della sua fattoria particolare.

Il benessere coinvolge una serie di aspetti, per molti dei quali la misura reale è soggettiva o, nella migliore delle ipotesi, fatta a livello ordinale. Non è integrato nel concetto di specie o nelle pratiche di gestione, e non esiste un “gold standard” contro il quale poter verificare eventuali scale utilizzate per la sua valutazione (Scott et al., 2001).

Ben consapevoli che non esiste un *gold standard* di riferimento per validare i modelli di valutazione del benessere animale, i primi tentativi dell’Istituto di Zootecnica di Piacenza si sono basati sul confronto con parametri ematici ed ematologici, unitamente ad un rilievo delle condizioni sanitarie su tutti gli animali (Calamari et al. 2003 e 2004).

In seguito il tentativo di validazione è stato esteso ad un maggior numero di allevamenti rilevando una soddisfacente relazione tra i punteggi di benessere ottenuti mediante l’applicazione del modello SDIB e alcuni parametri ematici, in particolare con il potassio e il glucosio (Dellabona, 2006). Anche con il cortisolo basale si sono osservate alcune discrete relazioni, evidenziando soprattutto una netta separazione fra allevamenti con benessere molto ridotto rispetto agli altri (Dellabona, 2006). Quest’ultimo parametro non è tuttavia scevro da difficoltà relativamente alle modalità di prelievo ed alla interpretazione dei valori (Bertoni et al., 2005).

Inoltre, in studi recenti (Bertoni et al., 2007) l’Istituto di Zootecnica di Piacenza ha proposto di utilizzare dei metodi di riferimento per validare dei modelli di valutazione del benessere applicati in allevamenti di bovine da latte, e un modello per la valutazione del benessere a livello individuale basato principalmente su indicatori diretti (parametri metabolici, endocrini e della funzione immunitaria).

I risultati, ottenuti dai primi tentativi di validazione del modello SDIB, ancora in numero limitato e parziali, sembrano indicare la sua validità e sembrano altresì indicare che attraverso l’impiego di diversi indicatori di tipo fisiologico si possa elaborare un valore di riferimento con cui validare i modelli applicativi di valutazione del benessere.

5. INDICATORI FISIOLGICI UTILIZZABILI PER LA VALIDAZIONE

Come è stato illustrato nei capitoli precedenti, tra gli indicatori fisiologici di benessere delle bovine da latte, quelli più spesso utilizzati sono: la frequenza cardiaca, la frequenza respiratoria, alcuni parametri metabolici, il cortisolo, la formula leucocitaria e la concentrazione di alcune proteine ematiche di fase acuta.

Per la valutazione di una condizione di stress cronico nell'animale, questi indicatori sono ritenuti validi ed accurati, va tuttavia sottolineato che per la maggior parte di questi parametri i metodi utilizzati per l'esecuzione del rilievo possono rappresentare dei fattori di grossa influenza sulla realistica valutazione dello stato di benessere degli animali. Il contatto con l'uomo e la manipolazione dell'animale necessaria per la rilevazione diretta del parametro o per il recupero delle matrici biologiche da sottoporre ad analisi, hanno ovvie conseguenze sul livello di stress subito dall'animale; inoltre è da considerare il fatto che l'utilizzo di questi indicatori richiede tempi lunghi e costi elevati. Per questi motivi, molti di essi non sono idonei per l'impiego in un modello di valutazione del benessere a livello di allevamento, ma possono essere utili in sistemi di valutazione del benessere individuale nell'ambito della ricerca, ma altresì per contribuire alla validazione dei modelli di valutazione del benessere animale di campo.

Tra questi, il cortisolo rappresenta il più importante indicatore dello stress cronico dell'animale malgrado ci sia una qualche difficoltà di interpretazione del suo livello basale e delle sue variazioni dopo il *challenge* con ACTH; aggiunta a questo, anche la fruttosamina può essere un valido indicatore di questa condizione in quanto è un parametro di facile determinazione analitica e permette un'analisi retrospettiva dello stress cronico.

5.1 CORTISOLO

Il cortisolo, ormone steroideo prodotto dalla porzione corticale delle ghiandole surrenali, (sia i livelli basali che le sue variazioni dopo l'ACTH challenge) è un possibile indicatore per la valutazione dello stress cronico. Sebbene un aumento di tale ormone si verifichi dopo uno stress acuto, esso mostra una qualche variazione molto prolungata prima e durante il distress, che sembrano essere ragionevolmente collegata ad una condizione di cattivo adattamento, cioè allo stress cronico (Mc Ewen, 1998; Lay and Wilson, 2004). Infatti un elevato livello di cortisolo sembra essere mantenuto quando c'è l'incapacità di riacquistare l'omeostasi o dopo uno stress ripetuto. Tuttavia, alcuni risultati contraddittori emergono dalla letteratura relativi agli animali da allevamento. Broom (1988) osservò una iper-reattività negli animali sottoposti ad una condizione di stress cronico dopo alcuni challenges con ACTH e supporta la relazione tra elevati livelli di cortisolo basali e stress cronico, mentre Weiss et al. (2004) considera la iper-reattività conseguente

ai *challenges* con ACTH essere vera nei suini ma non nei bovini. Indubbiamente, l'interpretazione del cortisolo basale non è facile poiché è influenzato da una varietà di fattori, tra cui: il ritmo circadiano (Möstl and Palme, 2002); il campionamento (Negrão et al., 2004); la fase della lattazione (Bertoni et al., 2006a); il coito e l'allattamento (Manteca, 1998); la mungitura (Bertoni et al., 2005a; Rushen et al., 2007); il grado di abitudine dell'animale (von Borell, 2001; Smith and Dobson, 2002), ma anche altri ormoni (per esempio la vasopressina), possono potenziare la secrezione di ACTH; Rushen et al., 2007); le infezioni nonché le endotossine (Bertoni et al., 1991; Rushen et al., 2007).

Come altri ormoni, i glucocorticoidi hanno un ritmo circadiano che è stato riscontrato in numerose specie tra cui suini (De Jong IC, e coll., 2000), bovine da latte e tori (Thun R., e coll., 1996), pertanto questa ritmicità comporta un frequente campionamento. Si deve inoltre considerare che il prelievo di un certo numero di campioni comporta spesso il confinamento con conseguente cattura degli animali, operazioni che comportano uno stress per gli stessi e che possono quindi determinare un'alterazione dei risultati (Hopster H., e coll., 1999). Per superare le difficoltà legate sia alla interpretazione dello stress dovuto al contenimento ed al prelievo di sangue che dei livelli basali di tale parametro, alcuni autori hanno studiato delle procedure di campionamento non invasive e quindi la sua determinazione in matrici biologiche differenti dal plasma tra cui: le urine (Hay M., Mormede P., 1998), la saliva (Cooper TR., e coll., 1989), il latte (Shutt and Fell, 1985; Verkerk GA, e coll., 1998) e le feci (Morrow et al., 2002; Möstl and Palme, 2002).

Il livello di cortisolo è in equilibrio con i differenti compartimenti e il campionamento di questi ultimi materiali è generalmente considerato poco invasivo. In questi materiali, il rilevamento e l'interpretazione, non sono tuttavia semplici per diverse ragioni. Prima di tutto, il livello può essere più basso rispetto a quello del sangue (per esempio è circa 10 volte meno nella saliva; Negrão et al., 2004); l'ormone può essere coniugato prima dell'escrezione nelle urine o nelle feci (Möstl and Palme, 2002), e ancora trasformato dai batteri nell'intestino; inoltre il livello può anche mostrare delle fluttuazioni nelle feci (Möstl and Palme, 2002) e l'escrezione può essere ritardata (di circa 12 ore nelle feci), sebbene quest'ultimo punto non abbia rilevanza durante una condizione di stress cronico poiché i livelli attesi si suppone che siano permanentemente elevati.

Pertanto, i dati disponibili rimangono ancora insoddisfacenti, nonostante alcuni sforzi verso la standardizzazione (per esempio il rilevamento dei metaboliti del cortisolo nelle feci, Möstl and Palme, 2002; Morrow et al., 2002). Tra questi differenti materiali biologici la valutazione del cortisolo o dei suoi metaboliti nelle feci sembra essere promettente; essa prevede una misura integrata della produzione di ormone lungo un periodo esteso di tempo. Per questi motivi, Morrow et al. (2002) hanno proposto l'utilizzo di questa tecnica non invasiva per il monitoraggio dello stato

di salute e di benessere nella bovina da latte, ma in combinazione con altre misurazioni fisiologiche e comportamentali. Comunque, questi risultati non sono molto chiari e ulteriori studi sono necessari prima di sostituire la determinazione del livello di cortisolo nel plasma, che rimane l'indice fisiologico più comune.

In aggiunta ai livelli basali di cortisolo, si è prestata molta attenzione alla reattività della ghiandola surrenale dopo un *challenge* con ACTH, sebbene il conseguente livello del cortisolo nel plasma rimanga un punto controverso. A questo proposito, sembra utile considerare i risultati ottenuti con un metodo riconosciuto di valutazione della sensibilità della corteccia surrenale nei vertebrati: il *challenge* con ACTH (Verkerk et al., 1994) o un suo analogo (ACTH 1-24 tetracosactide).

La somministrazione dell'ACTH mima una usuale risposta allo stress provocando un aumento rapido nel livello di cortisolo circolante, seguita da un ritorno ai valori basali entro poche ore.

Sebbene questo *challenge* venga spesso utilizzato, ciò avviene con differenti protocolli: dosi diverse, tempo di prelievo, variabili differenti della risposta (per esempio il picco del cortisolo, tasso di incremento, tempo di ritorno ai livelli basali). I dati disponibili in letteratura sono stati recentemente riesaminati da Rushen et al. (2007) e hanno confermato la complessità del sistema ipotalamo-ipofisi-surrene.

Anche gli studi condotti presso l'Istituto di Zootecnica hanno evidenziato che il cortisolo basale valutato nel plasma può essere un indicatore molto utile per la valutazione della condizione di stress cronico e di conseguenza di benessere negli allevamenti di bovine da latte (Trevisi et al., 2005) confermando quanto riportato in letteratura. Tuttavia, è necessario evidenziare che l'interpretazione dei risultati richiede cautela perché ci sono numerosi fattori che possono alterare il risultato finale.

Un altro indicatore che può essere utile per la valutazione della condizione di stress cronico è la sensibilità delle ghiandole surrenali. Questa aumenta durante i primi giorni dello stress ripetuto sequenziale (prolungato aumento del livello di cortisolo dopo il *challenge* con ACTH), mentre tende a ridursi successivamente (veloce riduzione del livello del cortisolo raggiunto dopo il *challenge* con ACTH).

Questo implica che, in accordo con i precedenti autori, uno stress acuto ripetuto (successivo al *challenge* con ACTH) non necessariamente evolve in uno stress cronico, quando gli animali mostrano un adattamento e quindi il livello di cortisolo plasmatico si riduce gradualmente; al contrario, nel caso in cui sia abbia un cattivo adattamento dell'animale, la sensibilità della ghiandola surrenale rimane sostenuta e di conseguenza il livello di cortisolo sarebbe più elevato. I risultati non sono conclusivi e le modificazioni del livello di cortisolo in conseguenza del *challenge* con ACTH possono dipendere dall'importanza dello stress e dall'intervallo tra i gli stressori successivi.

In questo contesto, e in accordo con quanto riportato da Rushen et al. (2007), alcuni risultati provenienti dalla letteratura non sembrano essere così contraddittori; in particolare, i dati provenienti da Ladewig and Smidt (1989) hanno mostrato un più basso rilascio di cortisolo in risposta alle iniezioni con ACTH in tori apparentemente adattati alle condizioni di stress; questo suggerisce una riduzione della sensibilità della corteccia delle surrenali al *challenge* con ACTH. Al contrario, Munksgaard e Simonsen (1996) non hanno osservato una riduzione nel rilascio del livello di cortisolo nelle bovine da latte dopo una prolungata condizione di stress (3 settimane in cui le bovine erano state private della possibilità di coricarsi per 14 ore al giorno o erano sottoposte ad isolamento sociale): quindi il primo caso è un caso in cui l'animale si adatta alla condizione di stress, mentre il secondo potrebbe essere una condizione di stress cronico; tuttavia non tutti i ricercatori sono d'accordo con questa idea e suggeriscono che la condizione di stress cronico "dovrebbe risultare da un aumento iniziale della sensibilità della ghiandola surrenale seguito da una sua diminuzione" (Rushen et al., 2007).

Questi risultati che riguardano i livelli di cortisolo dopo ACTH *challenge* possono essere giustificati, in maniera analoga come le loro variazioni del livello basale da diversi fattori in grado di incidere sulla risposta delle surrenali. Tra i maggiori fattori vengono compresi: l'ambiente (inteso come stagione e temperatura), fisiologici (produzione di latte, età, momento della lattazione; Hasegawa et al. 1997; Bertoni et al., 2006a), genetici (Weiss et al., 2004; Kosti et al., 2006).

Uno dei più affascinanti aspetti è stato mostrato da Kosti et al. (2006) i quali hanno trovato un notevole rilascio di ACTH dopo 30 minuti in conseguenza di uno stress da contenimento, ma solo un po' più elevato aumento del corticosterone, in una tipologia di ratto caratterizzata da un maggiore comportamento ansiogeno confrontata con quella non reattiva.

Questi risultati potrebbero infatti suggerire una bassa sensibilità delle ghiandole surrenali durante lo stress in soggetti che hanno uno stato ansiogeno, ma questo potrebbe anche comportare il raggiungimento di un plateau del livello di cortisolo nel plasma pertanto indipendente dal grado dello stimolo dell' ACTH. Quest'ultima ipotesi è stata parzialmente dimostrata presso il laboratorio dell'Istituto di Zootechnica di Piacenza (Bertoni et al., 2005b) conducendo una prova sperimentale su bovine da latte a cui è stata somministrata una differente dose (da 20 a 1000 mcg) di ACTH sintetico. Sorprendentemente, sia la dose più elevata che quella più bassa hanno provocato aumenti molto simili del livello massimo di cortisolo nel plasma, se si considera il picco; al contrario le dosi più elevate sono responsabili dei valori che rimangono più elevati per un tempo più prolungato.

La scarsa standardizzazione del challenge con ACTH (per esempio dose, momento in cui viene fatto il prelievo, tipo di risposta misurata) sembra, pertanto la più importante causa della variabilità del risultato. L'esperienza ottenuta presso l'Istituto di Zootechnica (Bertoni et al., 2005b) ha portato

all'individuazione delle seguenti condizioni standardizzate raccomandate: iniettare una bassa dose di ACTH (solo 20 mcg/iniezione), poiché i massimi livelli di cortisolo, all'interno di ciascun soggetto, non sembrano differire ad un più elevato dosaggio di ACTH; controllare il livello di cortisolo fino al suo ritorno a livelli basali (circa 3 ore dopo il picco); valutare l'area sottesa dalla curva dopo il picco, che noi suggeriamo essere il reale indice di reattività dell'animale al *challenge*. Usando questa procedura, i primi risultati ottenuti in prove sperimentali condotte presso l'Istituto di Zootecnica hanno mostrato che la risposta al *challenge* con ACTH misurata come l'area sotto la curva è risultata significativamente più elevata negli animali in stadio avanzato di lattazione e questo valore scarsamente influenzato dai livelli basali (Bertoni et al., 2006); mentre è risultata più bassa in bovine fresche (30-40 DIM) specialmente se presentano una marcata condizione infiammatoria immediatamente dopo il parto (Trevisi, dati non pubblicati), che è stata misurata in accordo con l'indice della funzionalità epatica (LFI) (Bertoni et al., 2006b).

5.2 LA FRUTTOSAMINA

E' degno di nota che lo stress acuto determini velocemente e transitoriamente modificazioni in alcuni parametri del sangue (per esempio un aumento dell'ematocrito, dei livelli di glucosio, degli acidi grassi non esterificati); tuttavia, come precedentemente menzionato, solo raramente lo stress acuto determina un peggioramento delle condizioni di benessere. Questi cambiamenti sono principalmente attribuibili a variazioni endocrine, ed in particolare all'azione dell'adrenalina, il principale ormone della reazione "fight or flight". Al contrario, ce ne sono altri che sono degli utili segnali di conseguenze o risposte persistenti, precedentemente definite come cattivo adattamento e sono indice di stress cronico.

L'elevato livello di glucosio e/o il suo frequente aumento nel sangue, entrambe condizioni relative a stress ricorrenti (principalmente derivanti dall'effetto dell'adrenalina e del cortisolo), sono stati correlati alla formazione delle proteine glicate, derivanti dal legame tra il glucosio, o un altro zucchero riducente, con le proteine. L'eccessivo livello di proteine glicate determina alcuni effetti pregiudizievoli, tra cui l'inattivazione di alcuni enzimi, l'inibizione dei legami delle molecole regolatrici, l'inappropriato "*cross licking*" delle proteine, la rallentata rimozione delle proteine anomale e alterata funzione del genoma (Kelly et al., 1997).

Per questa ragione le proteine glicate tra cui la fruttosamina, sono state studiate come possibili marcatori dello stress cronico e pertanto di un basso livello di benessere nell'uomo.

L'emoglobina glicata (HbA1c) è una forma di emoglobina usata principalmente per identificare la concentrazione plasmatica media di glucosio in un lungo periodo e deriva da una lenta reazione non enzimatica tra il glucosio e l'emoglobina. Il glucosio reagisce con il gruppo NH₂ della valina della

catena β (in cui il composto intermedio subisce un riarrangiamento detto di Amadori) formando una chetoamina stabile (Chandalia H.B. and Krishnaswamy P.R., 2002).

Nell'uomo, l'emoglobina glicata ha mostrato valori molto bassi nei soggetti normali (4-6% dell'emoglobina totale) ed elevati nei soggetti colpiti sia da diabete di tipo 1 che 2, ma anche in soggetti esposti a condizioni stressanti (per esempio stress psicogenico). In particolare, la concentrazione di emoglobina glicata è proporzionale alla concentrazione di glucosio media dei due mesi precedenti il prelievo (Daniel et al., 1999). La misura dell'emoglobina glicata è utilizzata nei pazienti con diabete mellito, soprattutto al fine di sorvegliare il controllo glicometabolico nel medio - lungo periodo (Sacks DB et al., 2002; American Diabetes Association, 2004); un ulteriore utilizzo di tale parametro è quello di fornire una misura del grado di qualità delle cure prestate ai pazienti con diabete da parte del personale medico e paramedico.

La fruttosamina è una chetoamina stabile derivante da una reazione non enzimatica irreversibile tra una molecola di glucosio con un gruppo amminico libero dei residui di lisina di una molecola proteica (Ambruster, 1987). Il processo biochimico che porta alla formazione della fruttosamina è rappresentato dal formarsi di un legame di tipo covalente fra il gruppo amminico della proteina e il gruppo carbossilico dello zucchero. Il prodotto che si forma è una base di Schiff (aldimina) altamente instabile dal punto di vista biochimico; tale reazione può anche essere reversibile secondo la legge dell'azione di massa e secondo i livelli glicemici. Dopo la formazione dell'aldimina, in presenza di una costante iperglicemia, la reazione può accedere alla seconda fase del processo, dove il composto intermedio subisce un riarrangiamento (detto di Amadori), caratterizzato dall'ossidazione del carbonile glucidico vicino al punto di reazione, e da riduzione del legame gluco - amidico con formazione di un derivato stabile chetoaminico (Dominiczak, 1991) o fruttosamina (Restori G., 1989).

Le fruttosamine derivanti dalle proteine del sangue tra cui le albumine sono conosciute come Glycated Serum Protein (GSP) o Glycated Albumin (Delpierre et al., 2002). Durante stati prolungati di iperglicemia, come nel diabete, le aldimine (basi di Schiff) rappresentano le basi per ulteriori riarrangiamenti molecolari che portano alla formazione degli AGEs (Advanced Glycation Endproducts, prodotti derivanti da un meccanismo di glicazione avanzata) (Brownlee M. et coll., 1988). Tali trasformazioni possono avvenire a livello dei fosfolipidi, dei nucleotidi e delle proteine, preferibilmente su quelle proteine che hanno un basso grado di ricambio fisiologico. Dopo alcuni giorni le basi di Schiff possono formare composti più stabili chiamati prodotti di Amadori. Affinché si possano formare gli AGEs sono necessarie trasformazioni più avanzate che durano settimane e che implicano reazioni di deidratazione, condensazione, frammentazione ossidazione e

ciclizzazione. La formazione di tali composti provoca una disfunzione endoteliale, reazioni infiammatorie e stress ossidativo (Meerwaldt et al., 2008).

La concentrazione di fruttosamina nel sangue periferico è una misura della glicazione di tutte le proteine del siero; approssimativamente il 80-90% di esse, nell'uomo, è attribuibile alla glicazione delle albumine (Johnson et al., 1982; Kennedy, 1992). Conseguentemente i principali fattori che influenzano la formazione della fruttosamina sono l'emivita delle siero albumine (che è riportata essere pari a 19 giorni nel cavallo, Mattheeuws et al., (1966)) e la media della concentrazione di glucosio a cui l'albumina è esposta mentre è in circolo. Pertanto, la concentrazione di fruttosamina nel sangue periferico, varia in accordo con il livello di glucosio valutato nel lungo periodo e/o il metabolismo proteico di un individuo.

I vantaggi della determinazione della fruttosamina rispetto a quelli dell'emoglobina glicata sono molteplici: facile eseguibilità del test per la sua determinazione, possibilità di stoccaggio dei sieri che consente una raccolta più agevole per la determinazione in un unico tempo (standardizzazione dell'errore metodologico). A differenza del dosaggio dell'emoglobina glicata, la fruttosamina sembra essere più fedelmente correlata alle fluttuazioni glicemiche e metaboliche del diabete probabilmente per la sua breve emivita; altri vantaggi sono rappresentati da: una maggiore rapidità nel raggiungimento di un compenso glicemico (dopo circa solo 7 giorni) mentre per ottenere una normalizzazione del valore di emoglobina glicata occorrono oltre quattro settimane di euglicemia, maggiore potere discriminante tra soggetti sani e soggetti diabetici, maggiore facilità e rapidità di dosaggio.

Secondo Malik et al. (2000) la determinazione dell'emoglobina glicata avrebbe una maggiore sensibilità rispetto alla fruttosamina per il controllo glicemico nei soggetti diabetici. Infatti in molti soggetti con elevati valori di emoglobina glicata si sono osservati normali livelli di fruttosamina. La specificità è risultata elevata per entrambi gli indicatori. Tuttavia l'emoglobina glicata può risultare alterata nei soggetti che hanno riportato perdite di sangue recenti, anemia emolitica o emoglobinopatia come la anemia falciforme. Questi soggetti non sono adeguati per essere sottoposti ai metodi che si usano per la valutazione della glicosilazione dell'emoglobina che tengono conto dell'elevato turnover della stessa emoglobina.

Esistono però anche alcune limitazioni, infatti l'attendibilità del risultato è correlata al tasso delle proteine sieriche, in tutte le condizioni in cui esiste una ipoprotidemia o un aumento del turnover metabolico delle proteine; per converso esiste una ottima correlazione tra tale indagine e la glicemia post prandiale, la glicemia media e quella a digiuno.

Dalle ricerche condotte nell'uomo sull'emoglobina glicata e sulla fruttosamina, è stato evidenziato che ogni modificazione di 3.3 mmol (60 mg/dl) nella media dei livelli di glucosio comporta un

aumento del 2% di emoglobina glicata (HbA1c) e 75 μ mol dei valori di fruttosamina (Bartol, 2000). Comunque, il limite più elevato dei lavori di riferimento di molti laboratori è pari a 285 mmol/l come equivalente del 7,5% di HbA1c piuttosto che il 6.5%.

In una ricerca di Wahid et al. (2001) nell'uomo si è indagato sulla relazione fra stress, iperglicemia, e rischio di una futura insorgenza di diabete mellito. I risultati hanno mostrato che i valori di fruttosamina in questi soggetti iperglicemici sono più correlati con la successiva insorgenza di diabete rispetto ai valori di glucosio. L'obesità non sembra interferire con i valori di fruttosamina dei soggetti diabetici e non diabetici (Woo et al., 1992). Sempre nell'uomo, i livelli di fruttosamina sono stati indagati da Tahara et al. (1995) come markers di stress cronico osservato in precedenza nei medesimi soggetti

Nell'uomo, non è presente un range di riferimento disponibile per interpretazione dei dati di questo parametro. I valori di riferimento dipendono da diversi fattori: età del paziente, sesso, campione della popolazione e la tipologia del test che viene utilizzato. Quindi, ciascuna relazione di laboratorio dovrebbe includere gli specifici range di riferimento del test.

Recentemente un numero di ricerche nella medicina veterinaria, hanno riportato il soddisfacente utilizzo della determinazione della concentrazione di fruttosamina per monitorare il controllo terapeutico della iperglicemia dei cani affetti da diabete mellito (Jensen and Aes, 1992; Jensen, 1992; Reusch et al., 1993; Graham, 1995) e dei gatti (Kaneko et al., 1992; Reusch et al., 1993).

Viceversa, Cantley et al (1991) hanno riportato che la concentrazione di fruttosamina nel siero è diminuita in pecore con una tossiemia gravidica come conseguenza di un prolungato stato di ipoglicemia.

Hogan e Phillips (2008) hanno proposto l'utilizzo della fruttosamina come indicatore per individuare precedenti situazioni di malnutrizione (in particolare carenza di energia). Sempre con lo scopo di analizzare in modo retrospettivo il livello medio di glucosio ed ottenere informazioni sul metabolismo energetico e sui disordini metabolici associati, la fruttosamina è stata oggetto di ricerche nelle bovine da latte in fase di transizione. Oppel et al. (2001) hanno osservato una significativa correlazione fra i livelli di fruttosamina nel plasma con i livelli medi di glucosio nelle due settimane precedenti il controllo. Gli stessi autori hanno riscontrato una correlazione significativa anche fra i livelli di emoglobina glicata con valori medi di glucosio delle 4 settimane precedenti il controllo.

Infine i livelli di fruttosamina nel periodo di transizione sono stati studiati in allevamenti con elevata prevalenza di dislocazione dell'abomaso (Stengärde et al., 2008). In queste condizioni sperimentali (allevamenti privati) non è stata trovata una relazione stretta fra fruttosamina e livelli di glucosio precedenti; gli autori ritengono che la mancata correlazione sia principalmente

conseguente alla scarsa variabilità della glicemia nella bovina. Tuttavia in queste condizioni di campo altri fattori potrebbero alterare la glicemia (tempo intercorso tra pasto e prelievo, tempo intercorso tra prelievo e centrifugazione). Nell'uomo la fruttosamina è stata utilizzata come indicatore per lo studio della quota di carboidrati presenti nella dieta, in particolare degli zuccheri semplici (Misciagna et al., 2004). Da questo studio si è osservata una maggiore utilità della fruttosamina rispetto all'emoglobina glicata.

Al contrario, Sorondo e Cirio (2009), non hanno trovato in bovine da latte sistematiche correlazioni significative fra la fruttosamina ed i livelli medi di glicemia nelle 3 settimane precedenti. In questa ricerca alcuni fattori di disturbo potrebbero aver influenzato i livelli di glucosio. Inoltre, la determinazione del glucosio è stata effettuata sul siero, con possibile effetto sul livello di glucosio nel tempo necessario per la sierizzazione.

Nel periodo di transizione si possono frequentemente osservare situazioni di stress ossidativo di entità variabile. Lo stress ossidativo promuove la formazione di fruttosamina. Una stretta relazione fra lipoperossidi e fruttosamina è stata osservata in pazienti non diabetici, non dializzati e con danni renali cronici (Selvaraj, 2002). Una stretta relazione fra fruttosamina e malondialdeide è stata osservata in pazienti anemici (Sundarm, 2007).

In aggiunta a questa applicazione nel monitoraggio della glicemia, è stato proposto che la misura della fruttosamina possa riflettere le alterazioni del tasso del turnover proteico (Heath and Connan 1991). Infatti i valori di fruttosamina tendono a diminuire con un aumento del turnover delle proteine plasmatiche. Così Heath e Connan (1991) hanno osservato una riduzione dei livelli di fruttosamina nel plasma in presenza di parassiti gastrointestinali, come conseguenza della “perdita” di proteine per effetto della gastroenteropatia. Tali circostanze non sono peraltro frequenti nelle lattifere e le variazioni non sono rapide.

Infine, Jensen et al (1993), hanno proposto come range di riferimento per il bovino le concentrazioni comprese tra 213,3 $\mu\text{mol/l}$ e 265 $\mu\text{mol/l}$. Questi autori hanno osservato che i valori non sono influenzati dalle variazioni acute della glicemia senza osservare quindi variazioni circadiane. Valori molto più ampi come range di riferimento (183-365 $\mu\text{mol/l}$) sono stati proposti da Hogan e Phillips (2008) per i bovini da carne.

6. SCOPO GENERALE

La problematica della valutazione del benessere degli animali è alquanto complessa e dibattuta poiché il termine *benessere* viene definito ed affrontato in modi diversi, ed è quindi imperativo per la sua valutazione che si giunga ad una minima condivisione sul significato di benessere animale. E' ampiamente accettato che una più accurata valutazione del benessere si ottiene con una combinazione di differenti tipi di rilievo: descrizione del sistema di allevamento e del suo management (indicatori indiretti) e risposta degli animali alle condizioni in cui vengono allevati (indicatori diretti); tuttavia l'impiego dei soli indicatori diretti, non consente di evidenziare le cause di riduzione di benessere in allevamento. Pertanto in un modello di valutazione del benessere animale, occorre quindi aggregare i diversi aspetti del benessere in un valore complessivo e includere livelli soglia in termini di benessere accettabile e non accettabile, fissando anche standard minimi per i singoli aspetti.

Alla luce di tutte le difficoltà messe in luce precedentemente è evidente che il modello di valutazione del benessere necessita di una validazione. Anche da quest'ottica, le difficoltà sono numerose dal momento che non esiste un *gold standard* di riferimento per il benessere e per i suoi diversi aspetti; alla luce di questo è necessaria una validazione. Pertanto, gli obiettivi che le nostre ricerche si prefiggono, si possono così riassumere:

- studiare indicatori di tipo biochimico-fisiologico utilizzabili per una valutazione più oggettiva del benessere/malessere degli animali, con il principale intento di evidenziare soprattutto le situazioni di stress di tipo cronico. Questi indicatori, insieme ad altri già consolidati con precedenti ricerche, potranno essere di aiuto per la validazione dei modelli di valutazione -certificazione del benessere di allevamento utilizzabili in campo;
- impiego di questi indicatori per contribuire alla validazione del modello SDIB di valutazione del benessere negli allevamenti di bovine da latte messo a punto dall'Istituto di Zootecnica.

CAPITOLO 7

***“DETERMINAZIONE DELLA FRUTTOSAMINA
QUALE INDICE DELLA CONCENTRAZIONE MEDIA DI
GLUCOSIO NEL PLASMA IN BOVINE NELLA FASE DI
TRANSIZIONE”.***

7.1 SCOPO

Come precedentemente osservato, la fase di transizione rappresenta il momento più critico del ciclo produttivo della bovina ad alta produttività. In particolare, la maggiore incidenza delle malattie che si verifica in questa fase ed il bilancio energetico rappresentano uno degli aspetti più delicati. Pertanto, nell'ambito della valutazione del benessere potrebbe essere di grande utilità disporre di parametri in grado di fornire, possibilmente con un solo controllo, informazioni sull'andamento del bilancio energetico e sulle possibili relazioni con le condizioni sanitarie del periodo di transizione. La fruttosamina, parametro che riflette la concentrazione media di glucosio nelle due-tre settimane che precedono il controllo, potrebbe essere utile al raggiungimento di tale obiettivo.

Pertanto, alla luce di quanto detto, gli scopi di questa ricerca sono stati:

- studiare la variabilità della fruttosamina nella fase di transizione e la sua relazione con i parametri del metabolismo energetico;
- studiare i rapporti con la produzione e lo stato sanitario degli animali.

7.2 MATERIALI E METODI

La prova è stata effettuata presso la stalla sperimentale dell'Istituto di Zootecnica dell'Università Cattolica del Sacro Cuore (UCSC). La stalla era a stabulazione fissa con poste dotate di tappetini morbidi in gomma; ogni posta era dotata di una mangiatoia individuale e di un abbeveratoio a tazza. La mangiatoia era dotata di un sistema automatico per l'erogazione programmata del foraggio, mentre il concentrato era erogato nella mangiatoia attraverso autoalimentatori individuali computerizzati; inoltre essa era dotata di controllo ambientale automatizzato ed illuminazione artificiale che costantemente garantiva alle bovine 14 ore giornaliere di luce.

Alla messa in asciutta, tutte le bovine erano sottoposte al pareggiamento degli unghioni. Le bovine erano mantenute legate e partorivano alla posta ove erano munte per mezzo di impianto di mungitura meccanica a secchio due volte al giorno (05:00 a.m. e 17:00 p.m) per tutta la durata della lattazione.

L'alimentazione delle bovine è stata individuale, a base di foraggi (fieno trinciato di graminacee, erba medica disidratata e insilato di mais) e concentrati pellettati, è stata formulata per soddisfare i fabbisogni teorici degli animali suggeriti dall'INRA (1988) e dall'NRC (2001).

I foraggi erano somministrati agli animali in due pasti uguali con un intervallo di 12 ore (07:30 a.m. e 19:30 p.m.), mentre il concentrato era somministrato in un numero di pasti variabile in funzione della fase fisiologica degli animali

La composizione media della razione giornaliera adottata durante la fase di asciutta era la seguente: 11.5 kg/capo al giorno di insilato di mais (con un range compreso tra 9.5-12 kg); 8 kg/capo al giorno di fieno di graminacee (con un range compreso tra 6-11 kg) e 0.7 kg/capo al giorno di un apposito concentrato per animali in asciutta ed una quantità variabile di concentrato per vacche in lattazione (con un range compreso tra 0-2 kg/d per capo) distribuito in due o quattro pasti (10:30 a.m. e 22:30 a.m.). Circa 8-10 giorni dalla data attesa del parto le vacche sono state preparate alla nuova lattazione con uno *steaming-up* ottenuto con l'aumento graduale della quantità del concentrato per lattazione sino ad un massimo di 2 kg/capo per giorno; contemporaneamente vi era una variabile riduzione della quantità di insilato e fieno ingerita spontaneamente dagli animali. Dopo il parto si è avuta l'introduzione dell'erba medica nella razione, la riduzione della quantità di fieno e l'aumento graduale del concentrato per vacche in lattazione; pertanto la razione giornaliera tipica della fase di lattazione (dopo almeno 30 giorni dal parto) era costituita da: 18 kg/capo di insilato di mais; 2 kg/capo di erba medica disidratata; 3 kg/capo di fieno di graminacee e 14 kg/capo di un apposito concentrato distribuito in otto pasti uguali con un intervallo di tre ore da ciascuna somministrazione. La quantità massima di concentrato utilizzata nella razione è stata fissata sulla

base della produzione di latte secondo il rapporto di 1 kg ogni tre litri di latte (senza superare 16-17 kg).

Per la prova sono state utilizzate 12 bovine di razza Frisona Italiana, controllate a partire da quattro settimane prima della data attesa per il parto fino a circa 70 giorni di lattazione. Tra le 12 bovine in prova, 5 si apprestavano al secondo parto, 3 al terzo, 3 al quarto parto e 1 al quinto. I parti hanno avuto luogo in maniera scaglionata nel periodo compreso tra Dicembre 2006 e Dicembre 2007.

All'inizio dei controlli (asciutta) le bovine hanno mostrato un peso medio pari a 728.16 ± 65.1 kg, il BCS pari a 2.56 ± 0.24 ed il numero medio dei parti è stato pari a 2.8 ± 1.03 .

Campioni di alimenti sono stati prelevati periodicamente ed analizzati presso il laboratorio dell'Istituto di Zootecnica, ai fini della determinazione dei principi immediati, oltre che della NDF, dell'amido (per i concentrati e il silomais), del pH e dell'azoto ammoniacale (per il silomais).

L'ingestione individuale di alimenti, corretta in funzione della quantità di alimento residuo, è stata rilevata giornalmente. Il peso vivo e le condizioni nutrizionali (Body Condition Score, BCS, su scala 0-5 secondo ADAS, 1986 e Edmonson e coll., 1989), sono stati rilevati ogni 2 settimane (prima del parto), un ulteriore controllo del peso è stato eseguito il giorno seguente il parto. Il peso vivo è stato misurato al mattino, prima della distribuzione degli alimenti.

La produzione di latte per ciascuna bovina è stata registrata ad ogni mungitura e sono stati raccolti campioni di latte rappresentativi alla mungitura del mattino (2 volte a settimana) per la determinazione di grasso, proteine, lattosio e cellule somatiche.

Sulla base della composizione chimica degli alimenti, del loro consumo, del peso vivo, della produzione di latte e della sua composizione, sono state calcolate le caratteristiche chimico-nutrizionali delle razioni di ogni bovina ed il relativo grado di copertura dei fabbisogni di energia netta in termini di UFL (INRA,1988) e di proteine metabolizzabili (NRC, 2001). Il calcolo delle razioni, effettuato per ogni bovina in occasione dei controlli ematici eseguiti prima e dopo il parto, è stato fatto utilizzando il software di razionamento Razio Best in uso presso l'Istituto di Zootecnica.

Campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena giugulare prima della somministrazione della razione del mattino con frequenza bi-settimanale da -29 a -10 e da 10 a 70 giorni dal parto e giornaliera intorno al parto, da -10 a 10 giorni dal parto. I campioni di sangue sono stati prelevati con tecnica Vacutainer, usando provette contenenti eparina di litio (10 IU/mL) come anticoagulante (Terumo Europe, Lovanio, Belgio) e messe immediatamente a bagno in acqua e ghiaccio fino all'arrivo in laboratorio, quando è stato determinato l'ematocrito utilizzando il microematocritometro su di un'aliquota di sangue intero centrifugata a 12.000 RPM per 11 minuti.

La restante frazione di sangue intero è stata centrifugata a 3.500 g e per 16 minuti ad una temperatura pari a 6°C, il plasma così ottenuto è stato suddiviso in cinque aliquote che sono state

conservate a -20°C fino al momento dell'analisi. Le determinazioni analitiche presso l'Istituto di Zootecnica della Università Cattolica del Sacro Cuore sono state eseguite mediante l'utilizzo di analizzatore automatizzato (ILAB 600, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA) a temperatura costante di 37°C. Esse hanno riguardato i parametri del metabolismo energetico: glucosio (mmol/l), acidi grassi non esterificati (NEFA, mmol/l) β -idrossi butirrato β OHB, mmol/l); quelli relativi al metabolismo proteico: urea (mmol/l); minerali: calcio (mmol/l), fosforo (mmol/l), magnesio (mmol/l), sodio (mmol/l), potassio (mmol/l), cloro (mmol/l), zinco (μ mol/l); gli indici della funzionalità epatica (bilirubina, μ mol/l) e dell'eventuale danno delle cellule epatiche: aspartato amino transferasi (GOT/AST, U/l); γ - glutamiltrasferasi (GGT, U/l) e fosfatasi alcalina (ALP, U/l); gli indici dello stato infiammatorio: proteine totali (g/l), globuline (g/l), proteine positive della fase acuta: aptoglobina (g/l) e ceruloplasmina (μ mol/l); proteine negative della fase acuta: albumine (g/l), colesterolo (mmol/l) e vitamina A (μ g/100ml). Le metodiche analitiche utilizzate sono descritte in Appendice.

Campioni di plasma ottenuti dai prelievi effettuati a -3; 7; 14; 28; 35; 45 e 60 giorni dal parto sono stati utilizzati per la determinazione della fruttosamina (μ mol/l). La metodica per la determinazione di questo ultimo parametro è descritta in Appendice.

Giornalmente è stato controllato lo stato di salute di tutte le bovine utilizzate nella sperimentazione con registrazione di tutti i problemi sanitari riscontrati e le terapie adottate.

Sulla base dei dati ematici è stato calcolato un indice aggregato della funzionalità epatica denominato LAI (Liver Activity Index, Trevisi e coll., 2001). Per il calcolo di tale indice si tiene conto delle variazioni osservate nel corso del primo mese di lattazione dei principali parametri delle sintesi epatiche (albumina, vitamina A come indice della *retinol binding protein*, e colesterolo totale come indice delle lipoproteine). Nel calcolo di questo indice, si tiene conto solo dei valori di questi parametri a 5, 13 e 27 giorni dal parto. I singoli valori dei parametri scelti per la valutazione dell'attività del fegato sono stati trasformati in unità di deviazione standard; questa è stata ottenuta calcolando la media e la deviazione standard di ogni parametro e ai singoli valori, si sottrae il valore medio della popolazione e lo si divide per la deviazione standard della popolazione stessa. Per ogni bovina è stato quindi calcolato il valore medio per ciascun parametro, dei valori così elaborati (3 valori per ogni parametro, corrispondenti ai prelievi effettuati a 5, 13 e 27 giorni dal parto). Si procede poi ad elaborare l'indice aggregato finale di ogni animale, ponderando con lo stesso peso relativo i valori dei 3 parametri considerati; questa procedura consente quindi di elaborare un indice aggregato in cui i parametri considerati pesano allo stesso modo nel determinare il valore finale. La formula finale per il calcolo di tale indice viene di seguito riportata:

LAI= ((l'unità di DS* dell'albumina a 5 DIM+ unità di DS dell'albumina a 13 DIM+ l'unità di DS dell'albumina a 27 DIM)+(l'unità di DS della vitamina A a 5 DIM+ unità di DS della vitamina A a 13 DIM+ l'unità di DS della vitamina A a 27 DIM)+(l'unità di DS del colesterolo a 5 DIM+ unità di DS del colesterolo a 13 DIM+ l'unità di DS del colesterolo a 27 DIM))/9.

*** = deviazione standard**

7.3. ANALISI STATISTICA

Per l'elaborazione statistica dei dati, gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi (terzili, composti ognuno da 4 animali) in base ai valori di fruttosamina, ottenuti dalla media dei suoi livelli rilevati a 28, 35 e 42 giorni dal parto. Il primo terzile è quello con i valori più bassi di fruttosamina (B), il secondo è quello intermedio (I) e il terzo è quello con i valori più elevati di fruttosamina (A).

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza per osservazioni ripetute, usando la procedura MIXED del SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC; release 9.1). Prima dell'analisi si è proceduto alla verifica della normalità della distribuzione di ciascun parametro mediante il test di Shapiro Wilks e, quando necessario, alla normalizzazione dei dati mediante trasformazione logaritmica. Il modello ha incluso fattori di classificazione fissi quali la fruttosamina (3 livelli) e la distanza parto (21 livelli), il fattore casuale individuale bovina entro gruppo e l'interazione fruttosamina * distanza parto . In particolare il modello statistico utilizzato è risultato il seguente:

$$Y_{iklm} = \mu + G_i + T_k + (G*T)_{ik} + B_{l(i)} + e_{iklm}$$

in cui:

Y_{iklm} = osservazione m-esima della l-esima bovina Bl entro l'i-esimo gruppo Gi alla k-esima classe di distanza parto Tk;

μ = media totale;

G_i = effetto dell'i-esimo gruppo;

T_k = effetto della k-esima classi di distanza dal parto, con un numero di livelli variabile in funzione dei parametri: 21 (-3, -2, -1.5, -1, -0.5, -0.25, 0.25, 0.5, 1,1.5, 2,2.5, 3,4,5,6,7,8,9,10 settimane di distanza parto) per i parametri ematici; 7 (-0.50, 1, 2, 4, 5, 6 e 9 settimane di distanza parto) per tutti gli altri parametri;

$(G*T)_{ik}$ = effetto dell'interazione tra l' i-esimo gruppo e la k-esima distanza dal parto;

$B_{l(i)}$ = effetto della l- esima bovina entro l'i-esimo gruppo;

e_{iklm} = effetto casuale o errore.

L'analisi è stata effettuata utilizzando la struttura di covarianza (Compound Symmetry), che dopo confronto con la struttura di covarianza Statistical Power mediante l'applicazione dei Test Akaike e Schwarz Bayesian è risultata la più efficace (Littell e coll., 1998). In tutti i casi le differenze sono state considerate significative per $P < 0.05$.

Sono state calcolate sia le Correlazioni di Pearson tra i valori di fruttosamina e gli altri parametri ematici (sia come valori rilevati ai singoli controlli e sia come valori medi dei 7, 14 e 21 giorni precedenti. Ad esempio il valore di glicemia medio dei 7 giorni precedenti (-7) il controllo della fruttosamina è stato ottenuto come dalla media dei valori di glicemia misurati a zero che corrisponde al giorno del controllo della fruttosamina, a -3/-4 ed a -7 giorni.) e le caratteristiche della razione (SAS Inst. Inc., Cary, NC, release 9.1). Queste correlazioni sono state calcolate utilizzando tutti i dati rilevati in corrispondenza dei controlli di fruttosamina (-3, 7, 14, 28, 35, 45 e 60 giorni dal parto).

Infine sono state elaborate Regressioni Lineari Semplice (procedura Stepwise) utilizzando come variabile dipendente la fruttosamina e come variabili indipendenti sia i parametri ematici che quelli relativi alle caratteristiche chimiche della razione, quali la copertura dei fabbisogni e le caratteristiche chimiche della razione (contenuto in sostanza secca, in amido, in proteine totali ed NDF) (SAS Inst. Inc., Cary, NC, release 9.1). Queste elaborazioni sono state effettuate utilizzando sia tutti i dati raccolti in tutti i controlli che quelli aggregati raccolti nell'intervallo tra la seconda e la quinta settimana di distanza parto.

I parametri ematici e la fruttosamina sono stati inoltre sottoposti ad Analisi delle Componenti Principali (procedura PRINCOMP del SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, release 9.1) utilizzando come variabili tutti i parametri ematici analizzati e le caratteristiche chimiche della razione (contenuto in sostanza secca, in amido, in proteine totali ed NDF).

Sono stati inoltre calcolati i valori di fruttosamina corretti sia per le proteine totali del siero che per l'albumina applicando le seguenti formule (Coppo et al., 2001):

$$\text{Concentrazione serica di fruttosamina corretta per le proteine totali } (\mu\text{mol/l}) = \frac{\text{concentrazione serica della fruttosamina } (\mu\text{mol/l}) * 6,2 \text{ (g/100 ml)}}{\text{proteine totali del siero (g/100 ml)}}$$

$$\text{Concentrazione serica di fruttosamina corretta per l'albumina serica } (\mu\text{mol/l}) = \frac{\text{concentrazione serica della fruttosamina } (\mu\text{mol/l}) * 3,3 \text{ (g/100 ml)}}{\text{albumine del siero (g/100 ml).}}$$

7.4 RISULTATI

Caratteristiche chimico-nutrizionali delle razioni

La concentrazione energetica della razione in asciutta è oscillata da un minimo di 0,72 UFL/kg di s.s. osservato in occasione dei primi controlli (-21 giorni dal parto) ad un massimo di 0,84 UFL/kg di s.s. osservato in prossimità del parto, il valore medio è risultato pari a $0,78 \pm 0,02$ U/ss. In lattazione la concentrazione energetica è risultata variabile fra 0,80 UFL/kg di s.s. osservata in alcuni animali nei primi giorni post parto, fino ad un massimo di 0,98 UFL/kg s.s. osservata negli animali più produttivi, il valore medio è risultato pari a $0,89 \pm 0,03$ U/ss. Il contenuto di proteine grezze delle razioni per le bovine in asciutta è oscillato da un minimo di 9,71% della s.s. del periodo di asciutta vero e proprio ad un massimo di 12,92% della s.s. in prossimità del parto (close-up), con un valore medio pari a $11,53 \pm 0,90$ %ss. Per la razione delle bovine in lattazione il contenuto in proteine grezze è variato da un minimo di 12,5% della s.s. osservato nei primi giorni di lattazione ad un massimo di 16,3% della s.s., il valore medio è risultato pari a $14,81 \pm 0,53$ %ss. I valori di NDF della razione per le bovine in asciutta sono oscillati da un valore massimo di 52% sulla s.s. osservato in occasione dei primi controlli (3 settimane prima del parto) ad un minimo di 42% sulla s.s. osservato in prossimità del parto, il valore medio è risultato pari a $47,77 \pm 1,91$ %ss. In lattazione il valore minimo di NDF è stato pari al 31% della s.s., mostrando un valore medio pari a $34,44 \pm 2,54$ %ss. Sempre in lattazione il valore di amido della razione non ha mai superato il valore del 27,5% della s.s. (durante l'asciutta il valore medio è risultato pari a $10,34 \pm 2,16$ %ss, mentre durante la lattazione pari a $20,24 \pm 2,98$ %ss).

Ingestione e dati produttivi

L'andamento dell'ingestione media di s.s. è riportato nella Figura 1. L'ingestione in prossimità del parto è risultata mediamente pari a 9,9 kg di s.s./capo per giorno (con un range compreso tra 8,5 e 13,3 kg di s.s./capo per giorno). Dopo il parto l'ingestione è progressivamente aumentata raggiungendo valori massimi nei singoli animali di poco inferiori ai 30 kg di s.s./capo per giorno.

I livelli produttivi delle bovine utilizzate per la prova sperimentale e registrati durante le prime 10 settimane di lattazione (Figura 1), non hanno mostrato anomalie durante tutto il periodo considerato; nel corso delle prime due settimane di lattazione la produzione media delle bovine è risultata pari a $30,38 \pm 6,02$ kg/d arrivando anche a toccare nel caso di un animale il valore di 46,85 kg/giorno a 14 giorni di lattazione. Nelle settimane successive si è avuto un aumento del livello produttivo che ha raggiunto valori medi di $45,93 \pm 3,66$ kg/d. Per alcuni animali sono stati raggiunti livelli produttivi prossimi ai 60 kg/capo per giorno.

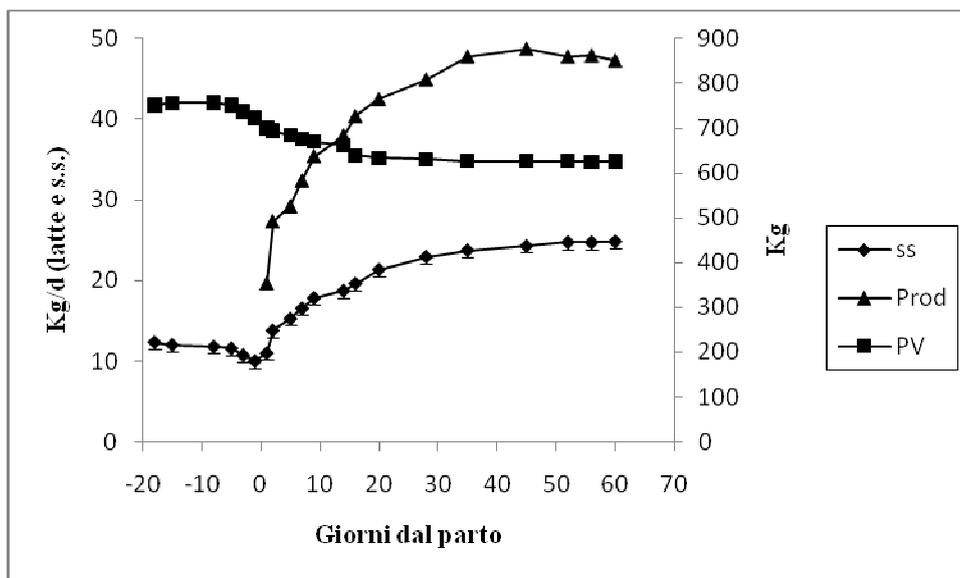


Figura 1. Valori medi (\pm ES) dell'ingestione di sostanza secca, della produzione di latte e del peso vivo nelle bovine controllate (12 animali).

Per quanto riguarda le caratteristiche del latte (Figura 2), il grasso ha mostrato un andamento tipico della fase di lattazione caratterizzato da un lieve incremento del suo contenuto nella prima settimana di lattazione e successivo netto calo. Anche il tenore proteico ha mostrato il tipico andamento della fase della lattazione caratterizzato da un notevole calo nelle prime settimane. L'andamento del lattosio è stato caratterizzato da un aumento nel corso delle prime settimane di lattazione.

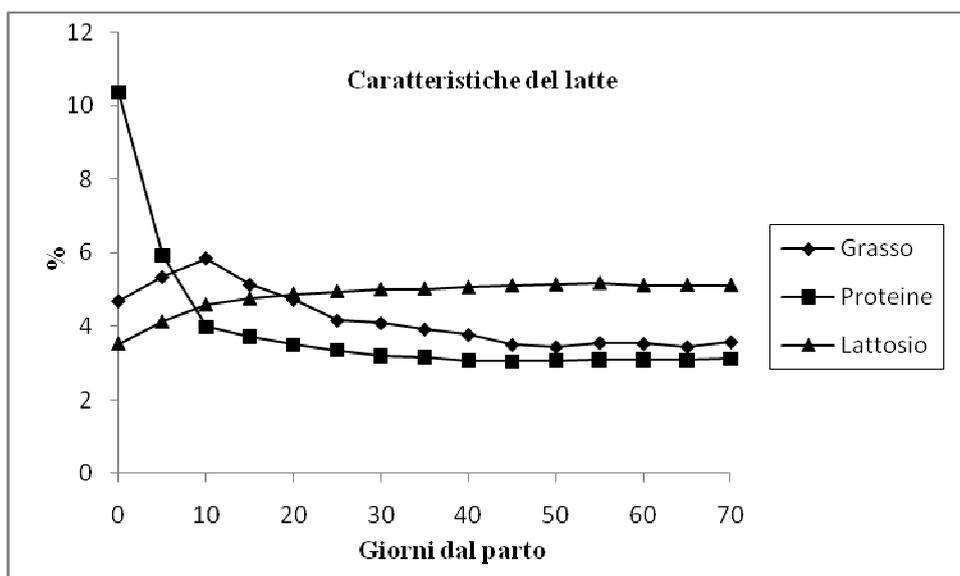


Figura 2. Andamento (espresso come media e deviazione standard) delle percentuali di grasso, proteine e lattosio nel latte delle bovine utilizzate per la prova sperimentale registrato nei primi due mesi di lattazione.

Il peso vivo (Figura 1) ha mostrato un andamento caratterizzato da una riduzione nelle prime settimane di lattazione con una successiva tendenza alla stabilità nella fase finale della sperimentazione.

Il Body Condition Score ha mostrato un calo cominciato nelle ultime settimane prima del parto e che si è protratto per tutto il periodo di lattazione studiato. A tre settimane prima del parto il valore medio di BCS è risultato pari a 2,61 (con un range compreso tra 2,15 e 2,93). In occasione dell'ultimo controllo, effettuato dopo le prime 10 settimane di lattazione, il valore medio di BCS è risultato pari a 1,95 (con un range compreso tra 1,60 e 2,50). In termini di diminuzione di BCS rilevata tra il primo controllo preparto e l'ultimo controllo in lattazione, la sua riduzione media è stata pari a -0,63 punti (con un range compreso fra -0,29 e -1,02).

La copertura energetica dei fabbisogni in Unità Foraggiere Latte (UFL) espressa in percentuale e calcolata senza tenere conto delle variazioni di peso vivo è risultata più che adeguata per gli animali in asciutta. Dopo il parto si è osservato un bilancio energetico negativo, con un grado di copertura dei fabbisogni che è progressivamente aumentato con il procedere della lattazione. In occasione degli ultimi controlli gli apporti energetici della razione coprivano mediamente il 90% del fabbisogno teorico.

Fruttosamina e relazione con la glicemia, con le albumine e con le proteine totali

In Tabella 1 sono stati riportati i valori di fruttosamina, di glucosio, di proteine totali, di albumine e di globuline rilevati nel plasma delle 12 bovine utilizzate per la sperimentazione. I valori medi di fruttosamina sono risultati più elevati nel controllo effettuato in asciutta rispetto ai controlli effettuati nel post parto. Durante la lattazione, i valori medi della concentrazione di tale parametro si sono caratterizzati per una progressiva riduzione nei primi 14 giorni dopo il parto. I valori più bassi, sia in termini di valori medi e sia in termini di valori minimi, sono stati osservati a 7 e 14 giorni di lattazione. Dal controllo effettuato a 28 giorni di lattazione i valori di fruttosamina sono progressivamente aumentati, raggiungendo un valore medio, a 9 settimane, pressoché identico al valore osservato nel preparto. Durante tutta la sperimentazione, i valori minimi osservati nei vari controlli sono oscillati fra 122,18 e 158,21 $\mu\text{mol/l}$, mentre quelli massimi hanno presentato un range compreso tra 188,73 e 208,92 $\mu\text{mol/l}$.

Tabella 1. Valori della concentrazione plasmatica di fruttosamina, di glucosio, di proteine totali, di albumine e di globuline rilevati negli animali utilizzati nella prova sperimentale (N = 12 animali in ogni controllo).

Parametro		Giorni dal parto						
		-3	7	14	28	35	42	60
Fruttosamina ($\mu\text{mol/l}$)	Media	182,87	163,43	157,16	167,90	170,22	173,31	177,39
	DS	15,17	23,51	19,54	16,31	15,48	14,42	10,88
	Min	155,79	122,18	125,48	138,74	139,74	150,37	158,21
	Max	208,92	195,11	188,73	193,54	194,10	193,87	198,02
Glucosio (mmol/l)	Media	3,99	3,22	3,35	3,79	3,89	3,96	4,21
	DS	0,38	0,61	0,58	0,18	0,12	0,35	0,29
	Min	3,23	2,22	2,21	3,57	3,73	3,18	3,86
	Max	4,39	4,13	4,04	4,11	4,16	4,47	4,64
Proteine totali (g/l)	Media	68,38	73,17	74,00	80,44	80,59	81,37	82,55
	DS	6,26	3,66	5,10	8,02	5,36	9,52	5,96
	Min	62,50	67,93	63,86	68,80	74,23	61,10	71,20
	Max	84,25	78,18	84,23	99,44	90,57	98,45	90,60
Albumine (g/l)	Media	35,77	34,96	35,45	37,44	37,98	38,12	38,96
	DS	2,36	2,25	2,34	2,55	1,81	3,53	1,83
	Min	32,23	32,08	30,48	33,17	34,42	31,14	34,95
	Max	40,07	38,40	38,53	41,93	40,76	45,54	42,51
Globuline (g/l)	Media	32,61	38,21	38,56	43,00	42,61	43,13	43,60
	DS	4,87	2,98	3,87	6,54	5,63	6,46	6,65
	Min	26,11	34,02	33,37	32,95	33,64	29,97	33,18
	Max	44,18	44,23	45,70	57,73	52,70	52,91	55,63

Nella Figura 3 viene riportato l'andamento medio del glucosio e della fruttosamina rilevati nel corso della prova. Il glucosio ha mostrato lo stesso andamento descritto per la fruttosamina, caratterizzato quindi da una riduzione della sua concentrazione plasmatica nel post parto, con i valori più bassi osservati a 7 e 14 giorni dopo il parto. Dal controllo effettuato a 28 giorni di lattazione i valori sono progressivamente aumentati. Durante tutta la sperimentazione, i valori minimi osservati ad ogni controllo sono oscillati tra 2,21 e 3,86 mmol/l , mentre quelli massimi hanno presentato un range compreso tra 4,04 e 4,64 mmol/l .

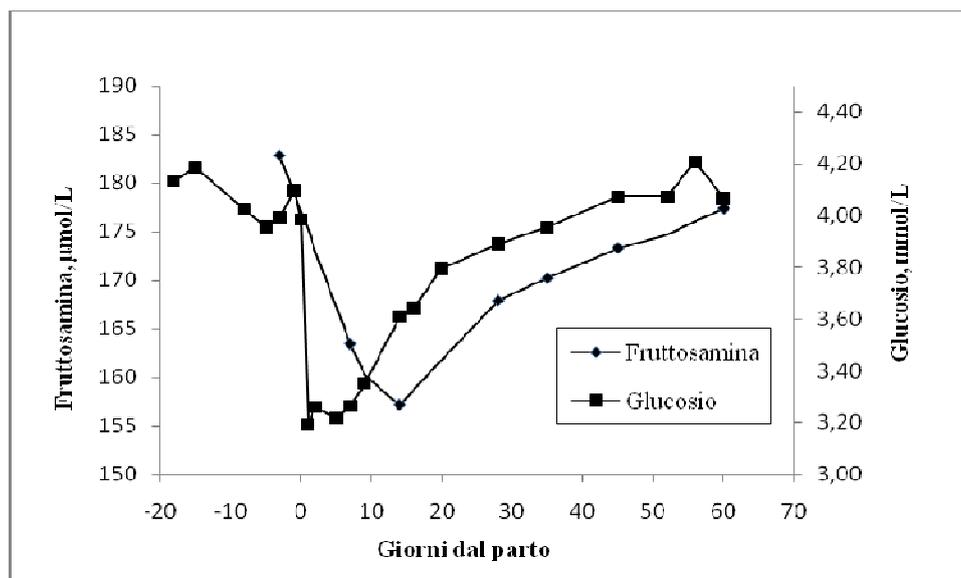


Figura 3. Andamento del glucosio e della fruttosamina nel plasma delle bovine controllate nel periodo finale di gravidanza e nei primi 70 giorni di lattazione (N = 12 animali ad ogni controllo).

Nella Tabella 2 vengono riportate le correlazioni semplici fra i valori di fruttosamina rilevati ad ogni controllo ed i livelli di glicemia rilevati in concomitanza con la misurazione della fruttosamina, ed altresì con i valori medi di glicemia rilevati nei 7, 14 e 21 giorni precedenti il prelievo. Dal suo esame si osserva che le correlazioni non sono risultate sempre significative. Queste sono risultate sistematicamente significative nei controlli effettuati durante il primo mese di lattazione, dove si ha una maggiore variabilità della glicemia. In particolare il valore medio di glicemia osservato nei 21 giorni precedenti il controllo è risultato meglio correlato e in maniera significativa con i valori di fruttosamina.

Tabella 2. Correlazioni semplici fra glucosio e fruttosamina calcolate in occasione di ogni controllo della fruttosamina (N = 12 animali in ogni controllo).

Variabile	Giorni di lattazione						
	-3	7	14	28	35	42	60
Glucosio ¹	0.52 ^(*)	0.74 ^{**}	0.71 [*]	0.46 ^(*)	0.18	0.48 ^(*)	0.49 ^(*)
Glucosio ²	0.48 ^(*)	0.75 ^{**}	0.69 [*]	0.72 ^{**}	0.34	0.30	0.61 [*]
Glucosio ³	0.46 ^(*)	0.76 ^{**}	0.75 ^{**}	0.66 [*]	0.63 [*]	0.43 ^(*)	0.62 [*]

^{1,2,3}: media dei valori del parametro calcolata rispettivamente 7, 14 e 21 giorni prima del controllo di fruttosamina.

(*): P<0.15; *: P<0.05; **: P<0.01; ***:P<0.001

I risultati della regressione lineare, in cui sono stati utilizzati come variabile dipendente la fruttosamina e come variabile indipendente i livelli di glicemia (come valori rilevati in concomitanza con il controllo della fruttosamina, e come valore medio della glicemia dei 7, 14 e 21 giorni precedenti), vengono riportati nella Tabella 4. In questa elaborazione sono stati utilizzati tutti i dati, ad eccezione dei controlli effettuati a 7 e 14 giorni di lattazione, per non includere i controlli nei giorni vicino al parto, dove la glicemia varia più repentinamente. Tuttavia, anche dalla elaborazione su tutti i dati, si confermano sostanzialmente i risultati riportati in Tabella 3. Dalla tabella si osserva che con il modello utilizzato i valori medi di glicemia rilevati nei 21 giorni precedenti il controllo spiegherebbero il 37% della variabilità della fruttosamina. Si evidenzia inoltre che un incremento di 1 mmol/l del glucosio medio del plasma dei 21 giorni precedenti il controllo comporta un aumento di circa 31 $\mu\text{mol/l}$ di fruttosamina.

Tabella 3. Parametri delle regressioni fra fruttosamina controllata a -3, 28, 35, 42 e 63 giorni dal parto e glicemia calcolata come media dei valori di glucosio a 7, 14 e 21 giorni prima del controllo della fruttosamina (N = 60).

Variabile dipendente	Variabile indipendente	Intercetta (media \pm ES)	Pendenza (media \pm ES)	R²	P
Fruttosamina ($\mu\text{mol/l}$)	Glucosio ¹ (mmol/l)	81 \pm 20	24.9 \pm 5.3	0.28	<0.001
Fruttosamina ($\mu\text{mol/l}$)	Glucosio ² (mmol/l)	76 \pm 27	26.6 \pm 5.1	0.33	<0.001
Fruttosamina ($\mu\text{mol/l}$)	Glucosio ³ (mmol/l)	58 \pm 21	31.3 \pm 5.5	0.37	<0.001

^{1,2,3}: media dei valori del parametro calcolata rispettivamente 7, 14 e 21 giorni prima del controllo di fruttosamina;

Nella Figura 4 vengono riportati gli andamenti della fruttosamina a confronto con quelli delle albumine. Anche per le albumine si è osservata una riduzione nelle prime settimane dopo il parto, con un successivo aumento progressivo. I valori minimi osservati ad ogni controllo hanno presentato un range compreso fra 30,48 g/l e 34,95 g/l e quelli massimi compresi fra 38,40 e 45,54 g/l.

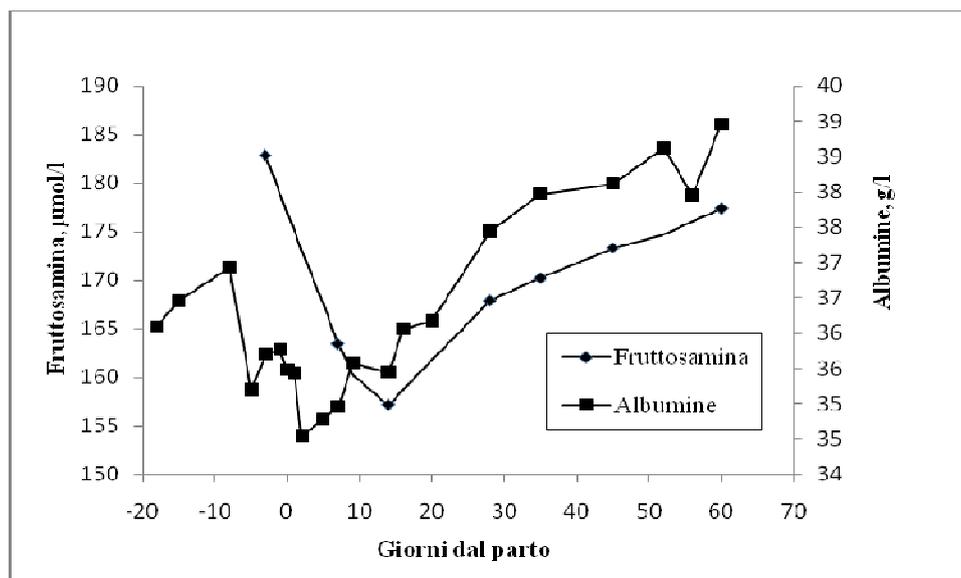


Figura 4. Andamento delle albumine e della fruttosamina nel plasma delle bovine controllate nel periodo finale di gravidanza e nei primi 70 giorni di lattazione.

Anche le albumine hanno mostrato correlazioni significative con la fruttosamina. Queste correlazioni vengono riportate nella Tabella 4. Dalla tabella si osserva che la fruttosamina, ad eccezione dell'ultimo controllo, è sempre risultata correlata con i valori di albumine. Le correlazioni sono risultate significative sia con i valori medi di albumine dei 7 giorni precedenti e sia con quelli dei 14 e 21 giorni precedenti il controllo.

Tabella 4. Correlazioni semplici fra albumine e fruttosamina calcolate in occasione di ogni controllo della fruttosamina (N = 12 animali in ogni controllo).

Variabile	Giorni di lattazione						
	-3	7	14	28	35	42	60
Albumine ¹	0.67*	0.68**	0.76**	0.60*	0.81**	0.63*	0.27
Albumine ²	0.69*	0.89***	0.76*	0.69*	0.79**	0.58(*)	0.16
Albumine ³	0.77**	0.88***	0.72**	0.69*	0.83**	0.57(*)	0.16

^{1,2,3}: media dei valori del parametro calcolata rispettivamente 7, 14 e 21 giorni prima del controllo di fruttosamina;
 (*): P<0.15; (*): P<0.05; (**): P<0.01; (**): P<0.001.

Le correlazioni fra i valori di fruttosamina (corretti in base al contenuto di albumine) con le albumine sostanzialmente confermano le correlazioni elaborate sulla base della fruttosamina non corretta.

Anche con la regressione lineare, utilizzando come variabile dipendente la fruttosamina corretta e come variabile indipendente i livelli di glicemia, si confermano i risultati riportati in precedenza. Con l'elaborazione sulla base dei dati corretti di fruttosamina si sono osservati valori di pendenza

delle curve leggermente più basse. Infatti, un incremento di 1 mmol/L del glucosio medio del plasma dei 21 giorni precedenti il controllo comporta un aumento di circa 28 $\mu\text{mol/l}$ di fruttosamina. Anche in questo caso il valore della pendenza della curva è più basso quando si considerano i valori di glicemia di un periodo precedente più breve (14 e 7 giorni). Quando si considerano i 14 giorni precedenti il coefficiente è risultato pari a $23,5 \pm 5,6$ e pari a $23,9 \pm 5,7$ quando si considerano i 7 giorni precedenti.

Le proteine totali, le albumine e le globuline hanno invece mostrato un progressivo aumento durante tutta la durata della sperimentazione. I valori minimi assunti da tali parametri ad ogni controllo hanno presentato un range compreso tra 61,10 e 74,23 g/l per le proteine totali; tra 30,48 g/l e 34,95 per le albumine; tra 26,11 g/l e 34,02 g/l per le globuline. Mentre quelli massimi hanno presentato un range compreso tra 78,18 e 99,44 g/l sempre relativo alle proteine totali; tra 38,40 e 45,54 g/l per le albumine ed infine tra 44,18 e 57,73 g/l per le globuline (Tabella 1)

Le correlazioni fra le proteine totali e la fruttosamina sono risultate significative quando si considerano tutti i dati (con il valore medio di proteine totali rilevato nei 21 giorni precedenti il controllo si è evidenziato un valore di $r = 0,31$; $P < 0,05$). Analizzando i singoli controlli si sono osservate correlazioni positive e significative ($P < 0,05$) solo in occasione del controllo effettuato 7 giorni dopo il parto. I valori di fruttosamina non sono risultate correlate con i valori di globuline.

Fruttosamina e relazione con l'ingestione ed i parametri produttivi

Dal confronto fra i parametri chimico-nutrizionali delle razioni con i valori di fruttosamina si sono osservate solo sporadiche correlazioni con il contenuto di amido, di NDF e di proteine grezze. Al contrario si è osservata una correlazione positiva con il grado di copertura del fabbisogno teorico di energia. Dall'elaborazione di tutti i dati si sono osservati valori di r compresi fra 0,38 e 0,43 (tutti per $P < 0,001$) per le correlazioni con il grado di copertura del fabbisogno energetico rilevato nei 7, 14 e 21 giorni precedenti. Tuttavia, analizzando i singoli controlli si sono evidenziate correlazioni positive e significative solo per il controllo effettuato a 35 giorni di lattazione ($r=0,55$; $P=0,08$ con la copertura media del fabbisogno di energia dei 21 giorni precedenti).

Deboli correlazioni positive sono state osservate con l'ingestione media di sostanza secca dall'analisi di tutti i dati ($r=0,26$; $P < 0,05$ con l'ingestione media dei 21 giorni precedenti). Analizzando i singoli controlli si è osservata una correlazione positiva e significativa solo per il controllo effettuato a 35 giorni di lattazione ($r=0,61$; $P < 0,05$ con l'ingestione media di sostanza secca dei 21 giorni precedenti). Analoga correlazione ($r=0,56$; $P=0,057$) si è osservata fra la fruttosamina media dei controlli effettuati a 28, 35 e 42 DIM con l'ingestione rilevata 1 settimana prima del parto.

Dall'analisi dei singoli controlli, non sono state evidenziate correlazioni significative tra fruttosamina e produzione di latte, ad eccezione dell'ultimo controllo dove si è osservata una debole correlazione positiva ($P < 0,15$). Considerando invece tutti i dati, la produzione è risultata significativamente correlata con la fruttosamina ($r = 0,35$; $P < 0,01$) per effetto del tutto casuale.

I valori di fruttosamina rilevati dopo 28 e 35 giorni di lattazione sono risultati correlati negativamente in modo significativo ($r = -0,74$; $P < 0,05$) con il calo di BCS (espresso come valore assoluto) rilevato tra l'inizio ed il termine dei controlli. Viceversa i valori di fruttosamina non hanno evidenziato correlazioni con i valori di BCS riscontrati in occasione dei singoli controlli. La fruttosamina non ha mostrato infine correlazioni significative con i valori di peso vivo e con le variazioni del peso stesso osservate.

Fruttosamina e condizioni metaboliche, produttive e sanitarie degli animali

Come premesso nella sezione dedicata all'elaborazione statistica e come è stato brevemente accennato nel commento ai dati relativi alla produzione e alle caratteristiche qualitative del latte, al peso, al BCS, alla quantità di sostanza secca ingerita, alla copertura dei fabbisogni in energia latte e in proteina metabolizzabile, i 12 animali utilizzati per la prova sperimentale sono stati suddivisi in tre gruppi: terzile FB (animali aventi valori di fruttosamina bassi), FI (animali aventi valori di fruttosamina intermedi) e FA (animali aventi valori di fruttosamina alti) in base della media dei valori di tale parametro rilevati a 28, 35 e 42 giorni dal parto. Pertanto, di seguito sono stati presentati i risultati relativi a questa ripartizione. L'analisi statistica è stata realizzata considerando il periodo di tempo compreso tra i 21 giorni prima del parto e i 60 giorni successivi. Sono state riportate le medie relative al periodo considerato dei parametri ematici valutati nel corso della prova e sono stati raggruppati in base al loro significato fisiologico, evidenziando eventuali differenze significative tra i tre gruppi di animali ed eventuali variazioni significative tra i tre gruppi relativamente all'interazione Classe fruttosamina x giorni dal parto. Nei risultati, le differenze tra i gruppi di animali, sono state considerate significative per * = $P < 0,10$; ** = $P < 0,05$ e *** = $P < 0,001$ (Tabella 5).

Tabella 5. Valori di significatività dei fattori utilizzati nell'analisi della varianza dei dati ematici controllati.

Parametri	Unità di misura	Modello		Covariata
		Classe Fruttosamina	Classe Fruttosamina *Distanza parto	Distanza Parto
Ematocrito	l/l	ns	ns	***
Glucosio	mmol/l	**	ns	***
Colesterolo	mmol/l	ns	**	***
Urea	mmol/l	ns	ns	***
Calcio	mmol/l	ns	ns	***
Fosforo	mmol/l	ns	ns	ns
Magnesio	mmol/l	ns	ns	***
Sodio	mmol/l	ns	ns	***
Potassio	mmol/l	ns	ns	***
Cloro	mmol/l	ns	ns	***
Zinco	μmol/l	ns	ns	***
Ceruloplasmina	μmol/l	ns	ns	***
Proteine totali	g/l	*	ns	***
Albumine	g/l	ns	ns	***
Globuline	g/l	ns	ns	***
Aspartato aminotransferasi (GOT)	U/l	ns	ns	***
γ-Glutamiltransferasi (GGT)	U/l	**	ns	***
Bilirubina	μmol/L	ns	ns	***
Fosfatasi alcalina	U/l	ns	ns	***
Aptoglobina	g/l	*	ns	***
βOHβ	mmol/l	ns	ns	***
NEFA	mmol/l	ns	ns	***
Fruttosamina	μmol/l	***	ns	***

Fra i tre gruppi suddivisi in base ai valori di fruttosamina si sono osservate differenze, anche se complessivamente non significative a causa del ridotto numero di animali, in termini di peso vivo, produzione di latte ed ingestione. L'effetto distanza dal parto è sempre risultato significativo; al contrario l'interazione classe fruttosamina x distanza dal parto non è risultata significativa. Il gruppo di animali appartenenti alla classe fruttosamina intermedia ha mostrato valori significativamente più bassi di peso vivo rispetto alla classe fruttosamina bassa nei giorni precedenti al parto ($790,12 \pm 6,57$ vs. $691,07 \pm 18,14$ kg, $P < 0,05$ a 5 e a 3 giorni prima del parto) e nei 52

giorni successivi ($699,20 \pm 29,10$ vs. $613,65 \pm 24,23$ kg, $P < 0,05$ fino a 49 giorni di lattazione).

Valori intermedi sono stati osservati per gli animali dell'altro gruppo.

Il livello produttivo degli animali appartenenti alla classe fruttosamina intermedia è risultato superiore (n.s.) rispetto a quello degli animali appartenenti agli altri due gruppi (mediamente $42,6 \pm 2,42$ kg/capo per giorno in FI vs. $37,3 \pm 2,43$ kg/capo per giorno degli altri due gruppi).

Il gruppo di animali appartenenti alla classe fruttosamina intermedia ha mostrato valori di sostanza secca ingerita mediamente più elevati (n.s.) rispetto agli altri due gruppi. Le differenze (n.s.) si sono osservate già prima del parto (a -21 giorni dal parto l'ingestione è risultata pari a 13,4; 12,8 e 10,8 kg/capo per giorno rispettivamente per FI, FA ed FB). In prossimità del parto si è avuto un calo, mantenendo comunque le differenze fra i gruppi. Anche dopo il parto l'ingestione si è mantenuta mediamente più elevata in FI e più bassa in FB, con differenze significative 21 giorni dopo il parto (rispettivamente 20,19 vs 16,03 kg/d, $P < 0,05$).

Il grado di copertura del fabbisogno teorico di energia, calcolato senza tenere conto delle variazioni di peso vivo, è stato superiore al 100% prima del parto in FA ed FI; al contrario in FB non si è raggiunta la completa copertura del fabbisogno teorico. Queste differenze non sono risultate tuttavia significative. Dopo il parto in tutti i gruppi si è osservato il tipico deficit energetico che è stato lentamente colmato in modo quasi completo a 10 settimane dopo il parto. Il grado di copertura del fabbisogno energetico è risultato mediamente più elevato (n.s.) in FA rispetto agli altri due gruppi (Figura 5).

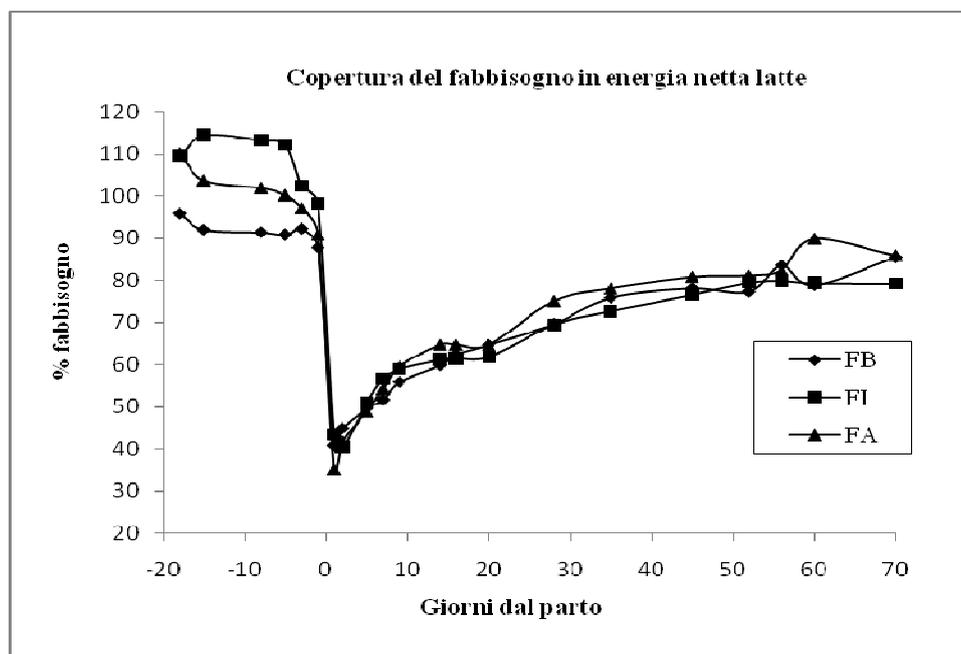


Figura 5. Andamento della copertura del fabbisogno teorico di energia nei tre gruppi di bovine suddivise (FB, FI ed FA: valori bassi, intermedi ed alti) in base al valore medio di fruttosamina rilevata a 28, 35 e 42 giorni di lattazione. Il Pooled standard error è pari a 5,13.

Per il Body Condition Score (Figura 6) non sono state registrate differenze significative tra gli animali utilizzati nel corso della prova sperimentale. Tale parametro ha mostrato una variazione significativa fra i tre gruppi considerati relativamente all'interazione "classe fruttosamina * distanza parto", con una riduzione di BCS più pronunciata negli animali del FB (-0,73 punti di BCS) rispetto agli altri due gruppi (-0,62 punti in FI e 0,61 in FA).

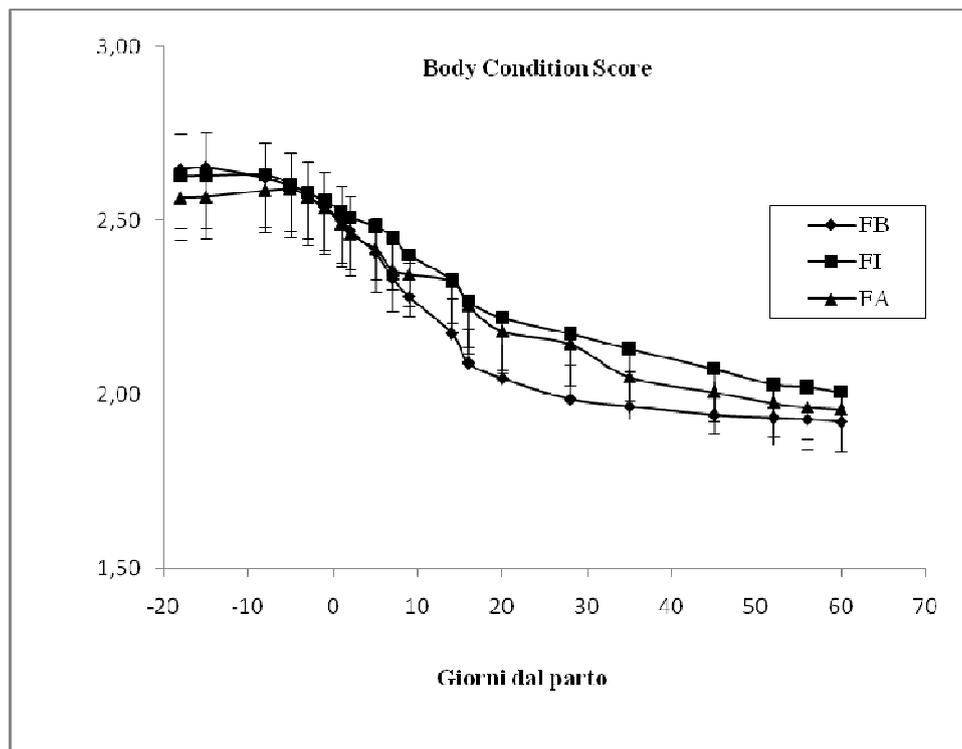


Figura 6. Andamento del BCS (LS means ± ES) nei tre gruppi di bovine (FB, FI ed FA: valori bassi, intermedi ed alti) suddivise in base ai valori di fruttosamina rilevati a 28, 35 e 42 giorni di lattazione).

Dall'elaborazione dei dati ematici mediante analisi della varianza è stato evidenziato che: il fattore classe fruttosamina è risultato significativo, oltre che per i valori di fruttosamina, anche per il glucosio, le albumine, la GGT e l'aptoglobina; l'effetto distanza dal parto è risultato significativo per tutte le variabili (ad eccezione del fosforo) ed infine l'interazione classe fruttosamina x distanza parto è risultata significativa solo per il colesterolo.

L'andamento della concentrazione plasmatica di fruttosamina nei tre gruppi di animali è mostrato nella Figura 7.

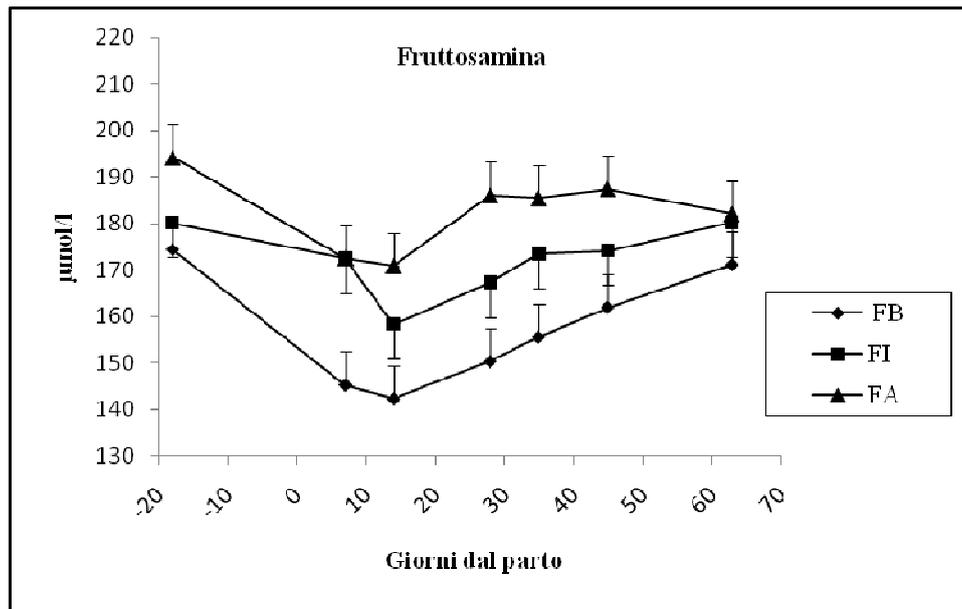


Figura 7. Andamento di fruttosamina (LSmeans \pm ES) riscontrata nei tre gruppi di bovine (FB, FI ed FA: valori bassi, intermedi ed alti) a -3, 7, 14, 28, 35,45 e 63 giorni dal parto.

L'andamento di tale parametro in tutti e tre i gruppi di animali considerati è stato caratterizzato da una progressiva riduzione della sua concentrazione nell'immediato post parto rispetto ai valori registrati nel preparto, seguita da un incremento che ha interessato il periodo dalla 2 alla 8 settimana dopo il parto. Durante tutti i controlli effettuati, gli animali appartenenti al gruppo FB hanno mostrato dei valori più bassi di tale parametro rispetto a quelli registrati negli altri due gruppi.

Il glucosio (Figura 8) ha mostrato il tipico andamento con differenze fra i gruppi. Dopo il parto si è osservata una riduzione repentina che è risultata molto accentuata negli animali appartenenti al gruppo FB. La concentrazione di glucosio sia nei 20 giorni che precedono il parto che nei 70 giorni successivi, è risultata simile nei tre gruppi di animali anche se il gruppo di animali FB ha mostrato valori di glucosio significativamente più bassi sia rispetto al gruppo di animali FI a -3 e a -1 giorno prima del parto (rispettivamente 3,64 vs 4,23 mmol/l, $P < 0,05$ e 3,74 vs 4,36 mmol/l, $P < 0,05$) che rispetto a quello FA; in questo caso le differenze significative si sono riscontrate a 2, 7 e 14 giorni dopo il parto (rispettivamente 2,65 vs 3,45 mmol/l; 2,86 vs 3,74 mmol/l e 3,22 vs 3,77 mmol/l, $P < 0,001$).

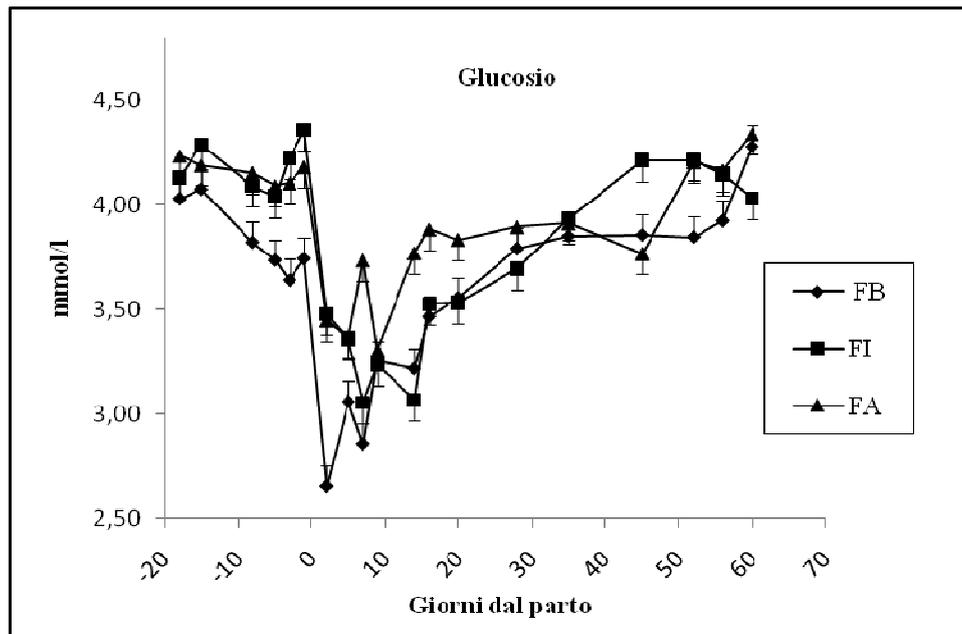


Figura 8. Andamento di glucosio (LS means \pm ES) riscontrato nei tre gruppi di bovine (FB, FI ed FA: valori bassi, intermedi ed alti) suddivise in base ai valori di fruttosamina rilevati a 28, 35 e 42 giorni di lattazione durante il periodo di controllo.

Prendendo ora in esame l'altro parametro, le albumine (Figura 9), più direttamente coinvolto nella genesi della fruttosamina, si osserva una diminuzione in FB già prima del parto e che prosegue anche nei primi giorni dopo il parto. Al contrario negli altri due gruppi la diminuzione dopo il parto è risultata molto lieve. Successivamente, si è avuto un recupero piuttosto rapido in tutti i gruppi di animali. Le differenze statisticamente significative osservate tra i tre gruppi di animali sono emerse tra il gruppo FB e quello FA a 5 e 28 giorni dopo il parto (rispettivamente 32,80 vs 36,50 g/l, $P < 0,05$ nel primo caso e 35,31 vs 39,57 g/l, $P < 0,001$ nel secondo caso).

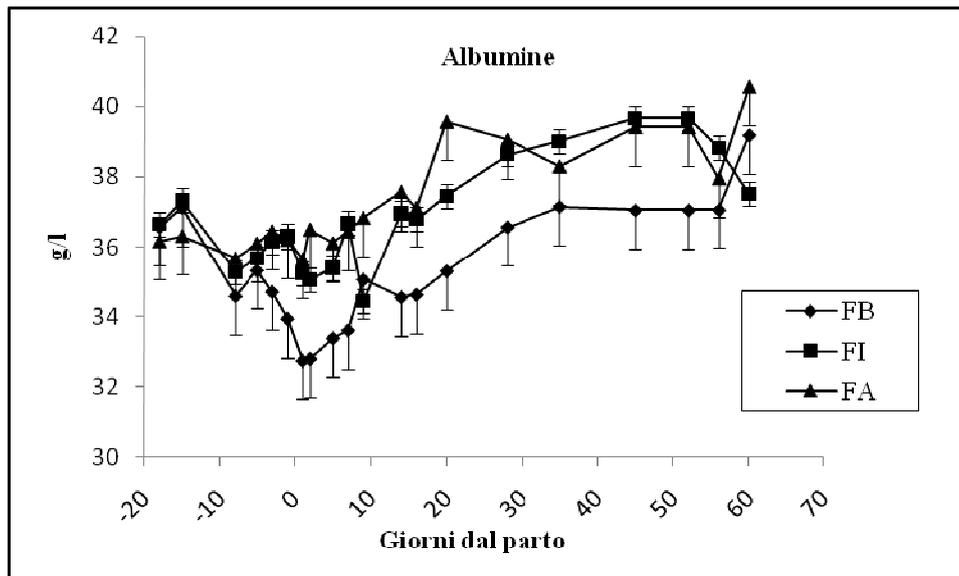


Figura 9. Andamento delle albumine (LS means \pm ES) riscontrato nei tre gruppi di bovine (FB, FI ed FA: valori bassi, intermedi ed alti) suddivise in base ai valori di fruttosamina rilevati a 28, 35 e 42 giorni di lattazione durante il periodo di controllo.

Per i parametri del metabolismo energetico, pur non avendo riscontrato un effetto significativo dell'effetto classe fruttosamina, riteniamo opportuno sottolineare alcune differenze osservate negli andamenti di alcuni parametri nei tre gruppi.

I NEFA (Figura 10) in tutti e tre i gruppi di animali hanno mostrato un progressivo aumento già immediatamente prima del parto, raggiungendo il picco a 2 giorni dopo il parto, seguito da un rapido calo nelle settimane successive al parto. Interessante è osservare che l'aumento preparto è risultato più evidente nel gruppo FB ed è proseguito dopo il parto. Questo gruppo di animali FB ha così mostrato dei valori significativamente più alti sia rispetto al gruppo FA che rispetto a quello FI (rispettivamente 0,62 vs 0,31 mmol/l, $P < 0,001$ e 0,62 vs 0,33 mmol/l, $P < 0,001$) 2 giorni dopo il parto. Il gruppo FB ha inoltre mostrato valori significativamente più elevati rispetto a quelli del gruppo FI a 2 e 7 giorni di lattazione (rispettivamente 1,12 vs 0,90 mmol/l, $P < 0,05$ e 0,84 vs 0,51 mmol/l, $P < 0,001$).

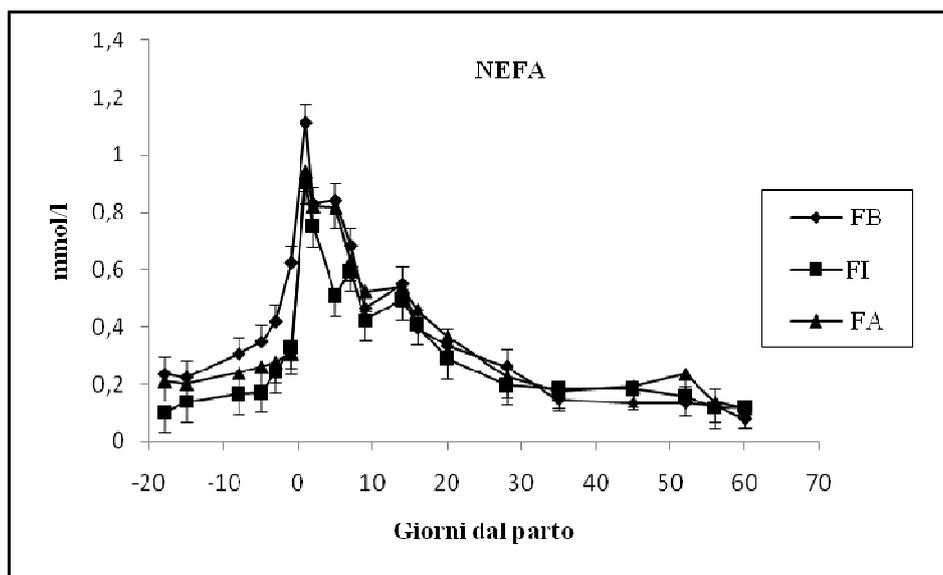


Figura 10. Andamento dei NEFA (LS means \pm ES) riscontrato nei tre gruppi di bovine (FB, FI ed FA: valori bassi, intermedi ed alti) suddivise in base ai valori di fruttosamina rilevati a 28, 35 e 42 giorni di lattazione durante il periodo di controllo.

Il β OHB (Figura 11) nei tre gruppi di animali ha mostrato un andamento pressoché analogo a quello dei NEFA nel corso delle ultime settimane che hanno preceduto il parto. Anche in questo caso i valori sono aumentati in maniera più evidente nel preparto nel gruppo FB. Successivamente il gruppo di animali FB ha mostrato un calo fino a circa la 2 settimana di lattazione, per poi aumentare in modo transitorio tra 14 e 21 giorni dopo il parto. Andamenti più regolari si sono osservati in FA e FI. Differenze significative sono state evidenziate tra i tre gruppi di animali a 2 giorni dopo il parto (2,29, valore medio per il gruppo FB, vs 1,41 mmol/l, valore medio per quello FA, $P < 0,05$), 9 (0,92, valore medio per il gruppo FB, vs 1,69 mmol/l, valore medio per FI, $P < 0,05$) e 14 (0,80, valore medio per il gruppo FB, vs 0,60 mmol/l valore medio per FA, $P < 0,05$ e 0,80 valore medio per il gruppo FB vs 1,74 mmol/l valore medio per FI, $P < 0,001$).

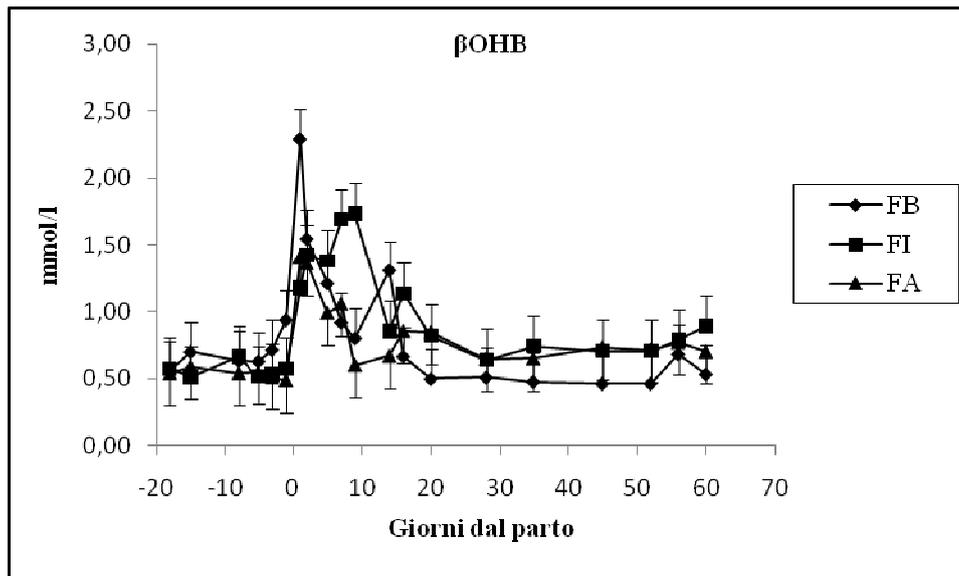


Figura 11. Andamento del β OHB (LS means \pm ES) riscontrato nei tre gruppi di bovine (FB, FI ed FA: valori bassi, intermedi ed alti) suddivise in base ai valori di fruttosamina rilevati a 28, 35 e 42 giorni di lattazione durante il periodo di controllo.

Relativamente al metabolismo proteico, la concentrazione di urea ha mostrato una differenza significativa un giorno prima del parto con valori più elevati in FB rispetto ad FA ed FI ($P < 0,05$).

Analizzando ora le proteine positive e negative di fase acuta del processo infiammatorio, si è osservato un effetto significativo della classe fruttosamina sui valori di aptoglobina. La sua concentrazione nelle settimane prima del parto ha mostrato in tutti e tre i gruppi, livelli normali ($< 0,2$ g/l). Con il parto, il livello è significativamente aumentato in tutti e tre i gruppi, anche se in FA e FB l'innalzamento è risultato più marcato (valori medi massimi compresi fra 0,5 e 0,6 g/l) rispetto al gruppo FI (valori medi massimi compresi fra 0,2 e 0,5 g/l). Le differenze, per il ridotto numero di animali, non sono risultate significative. Dopo la prima settimana di lattazione, si è avuto un calo piuttosto repentino di tale parametro in questi due gruppi. In FB si è osservato un nuovo aumento transitorio fra i 14 ed i 21 giorni.

La ceruloplasmina, altra proteina positiva di fase acuta, ha pure mostrato un calo nel corso dell'ultimo mese di gestazione e un aumento al parto che è proseguito approssimativamente fino alla 2,5 settimana dopo il parto. Il gruppo di animali FA ha mostrato valori più elevati di tale parametro in asciutta rispetto a quelli relativi agli altri due gruppi. Tuttavia in FA ed FI i valori con l'approssimarsi del parto sono lievemente diminuiti; al contrario in FB sono tendenzialmente aumentati. Dopo il parto i valori sono aumentati in tutti i gruppi, anche se in maniera più modesta in FI. Tra i tre gruppi di animali non sono state tuttavia evidenziate differenze significative durante tutto il periodo considerato.

Tra i parametri ematici che caratterizzano la risposta infiammatoria vanno inoltre considerati lo zinco e il calcio. Il calcio ha mostrato una tipica flessione nel periparto, confrontando i tre gruppi non sono state evidenziate delle differenze significative durante tutto il periodo considerato.

Lo zinco (Figura 12) ha mostrato un andamento tipico delle bovine peripartorienti, con un calo al parto ed un rapido recupero già durante la prima settimana di lattazione. Differenze significative tra il gruppo di animali FA e FB sono state riscontrate a -1,50 settimane prima del parto ($P < 0,05$) e a 2,5 settimane dopo il parto ($P < 0,001$).

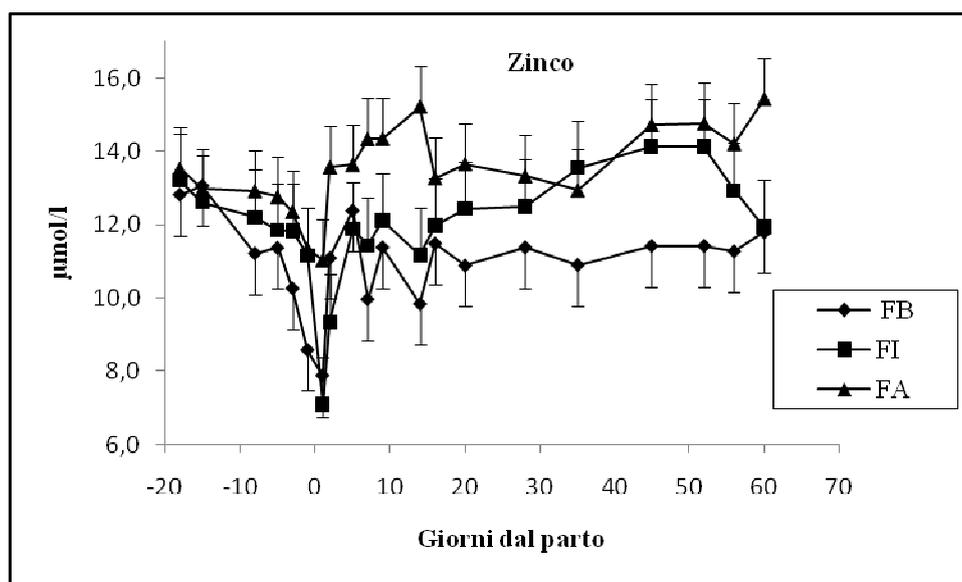


Figura 12. Andamento di zinco (LS means \pm ES) riscontrato nei tre gruppi di bovine (FB, FI ed FA: valori bassi, intermedi ed alti) suddivise in base ai valori di fruttosamina rilevati a 28, 35 e 42 giorni di lattazione durante il periodo di controllo.

Per le proteine negative della fase acuta (-APP), il colesterolo (Figura 13) totale ha mostrato un andamento simile nei tre gruppi di animali caratterizzato da un lieve calo in corrispondenza del parto. Successivamente è stato osservato un suo incremento progressivo a partire da pochi giorni dopo il parto e fino al termine della prova, assai più rapido in FA e FI. Differenze significative sono state riscontrate sia tra i gruppi FB vs FA a 28 (4,03 vs 5,14 mmol/l, $P < 0,05$), 35 (4,18 vs 6,02, $P < 0,001$), 45 (5,31 vs 6,38, $P < 0,05$) e 52 (5,90 vs 7,40, $P < 0,001$) giorni dopo il parto che tra quelli FB vs FI a 20 (3,54 vs 4,59 mmol/l, $P < 0,05$), 28 (4,03 vs 5,17 mmol/l, $P < 0,05$), 35 (4,18 vs 5,71, $P < 0,001$), 45 (5,31 vs 6,49, $P < 0,05$) e 52 (5,90 vs 6,95, $P < 0,001$) giorni dopo il parto.

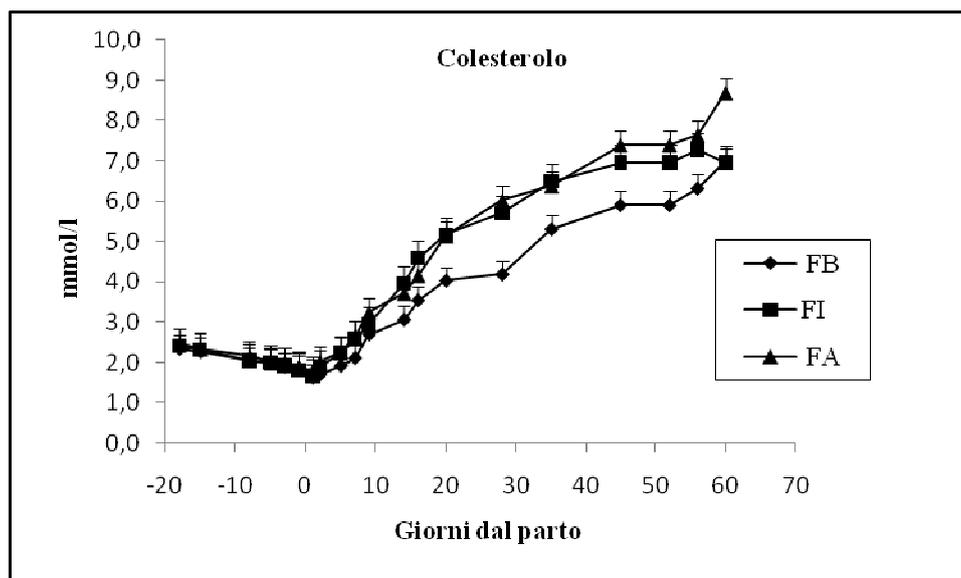


Figura 13. Andamento del colesterolo (LS means \pm ES) riscontrato nei tre gruppi di bovine (FB, FI ed FA: valori bassi, intermedi ed alti) suddivise in base ai valori di fruttosamina rilevati a 28, 35 e 42 giorni di lattazione durante il periodo di controllo.

La vitamina A, utilizzata come indice della *retinol binding protein*, è sempre risultata mediamente più elevata in FA.

Sulla base dei dati di colesterolo, vitamina A ed albumine è stato calcolato l'indice Liver Activity Index (LAI). I valori di LAI sono risultati negativi (inferiori a -0,85 ad eccezione di un soggetto con un valore di 0,106) nel gruppo FB, prossimi a zero (compresi fra -0,285 e 0,18) nel gruppo FI, e compresi tra -0,038 e 1,143 nel gruppo FA. Il valore medio di LAI delle bovine appartenenti alla classe fruttosamina bassa è risultato così pari a $-0,40 \pm 0,42$; quello degli animali della classe fruttosamina intermedia $-0,07 \pm 0,20$ ed infine quello degli animali appartenenti alla classe fruttosamina alta è risultato pari a $0,50 \pm 0,49$.

E' stata inoltre riscontrata una relazione positiva fra la fruttosamina media a 4-6 settimane di lattazione con il LAI ($r = 0,81$, $P < 0,001$); da tale relazione è stato osservato che gli animali appartenenti al gruppo FB sono stati quelli che hanno mostrato un più basso indice LAI.

Analizzando i risultati relativi ai parametri indicatori della funzionalità epatica, relativamente alla bilirubina, si è osservato un notevole innalzamento in corrispondenza del parto, in seguito il calo è risultato simile in tutti e tre i gruppi. Il gruppo di animali FB durante tutto il periodo considerato ha mostrato valori di bilirubina totale superiori rispetto a quelli degli altri due gruppi e sono state riscontrate differenze tra i gruppi FB vs FA e FB vs FI a 1 giorno dal parto (rispettivamente 7,16 vs 2,64 e 2,46 $\mu\text{mol/l}$).

Tra i parametri indici del danno epatico sono stati analizzati l'aspartato amino transferasi (GOT/AST) e la γ -glutamilttransferasi (GGT). I valori di GOT/AST non hanno mostrato differenze

fra i gruppi. Per contro per quelli di GGT, il gruppo di animali FB ha mostrato sia nel pre che durante il post parto valori significativamente più bassi rispetto a quelli degli altri due gruppi. Queste differenze sono conseguenza di valori tendenzialmente bassi in tutti gli animali FB (mediamente pari a 17,5 U/L rispetto a valori di 25,6 e 26,9 U/L rispettivamente in FI ed FA).

Infine per l'ematocrito, le proteine totali, le globuline e la fosfatasi alcalina non sono state riscontrate differenze rilevanti fra i tre gruppi di bovine. Solo per le proteine si sono riscontrate differenze significative fra FB e FI a 3 giorni prima del parto ($72,97 \pm 7,70$ vs $66,90 \pm 4,50$ g/L, $P < 0,05$) e a 35 e 49 giorni dopo il parto (rispettivamente $86,41 \pm 2,99$ g/L vs $77,24 \pm 3,24$ g/L, e $88,56 \pm 6,05$ $P < 0,05$).

Relativamente ai parametri del metabolismo minerale, solo il magnesio ha mostrato differenze fra i tre gruppi. Per questo parametro si è osservato un calo progressivo della sua concentrazione con l'avvicinarsi del parto nei tre gruppi di animali. Nelle prime settimane dopo il parto tale calo, è risultato più accentuato, soprattutto nel gruppo FB, che era anche quello che aveva presentato la concentrazione di tale parametro più bassa rispetto a quella degli altri due gruppi durante tutta la prova. A 3 prima del parto, il gruppo FB ha mostrato un valore significativamente più basso rispetto a quello registrato nel gruppo FI $1,01$ vs $1,04$ mmol/l ($P < 0,001$).

Per il P, il Na, il K ed il Cl non sono state registrate differenze significative tra i tre gruppi di animali durante tutto il periodo della prova.

Per l'ematocrito sono state riscontrate differenze significative tra i terzili di animali durante le ultime due settimane di gravidanza, tuttavia i valori si sono mantenuti ampiamente nella norma.

Per quanto riguarda lo stato sanitario non sono stati evidenziati problemi clinicamente manifesti prima del parto. Dopo il parto, a 17 DIM si è osservato uno stato febbrile in un animale del gruppo FB ed un caso di mastite clinica in un altro animale di FB. Sempre nel gruppo FB si sono osservati casi di diarrea (a 7 e 35 DIM). Casi di diarrea si sono osservati anche in due animali di FI (a 6 e 49 DIM in un animale ed a 6 DIM nell'altro) ed in un animale di FA (a 19 e 28 DIM). Nel corso dei primi 10 giorni di lattazione si è riscontrato nel latte la lieve presenza di grumi in 3 animali di FB, ma non attribuibili a mastite, la medesima osservazione è stata fatta in 2 animali di FI ed FA.

Regressione lineare

La regressione lineare (procedura stepwise) è stata eseguita tra i valori della concentrazione plasmatica di fruttosamina (variabile dipendente), con il grado di copertura del fabbisogno di energia e con i parametri del profilo metabolico (variabili indipendenti). Alcune delle variabili indipendenti (grado di copertura del fabbisogno di energia ed i parametri ematici glucosio, urea, proteine, albumine e globuline) sono state incluse nel modello sia come valore rilevato in

concomitanza con il controllo della fruttosamina e sia come valore medio di tutti i rilievi effettuati nei 7, 14 e 21 giorni precedenti.

I risultati relativi all'analisi della regressione lineare hanno mostrato che in tutti i modelli, applicati su diverse finestre temporali, si è sempre osservato l'inclusione, fra le variabili indipendenti, delle albumine e del glucosio. Dai modelli utilizzati si è osservato inoltre che le albumine hanno sempre fornito il maggiore contributo nello spiegare la variabilità della fruttosamina. Dalla elaborazione effettuata sui dati di fruttosamina rilevati a 28, 35 e 42 giorni di lattazione, che dovrebbero riflettere la situazione del primo mese di lattazione, nel modello sono state incluse le variabili albumine (valore medio dei 21 giorni precedenti) e glucosio (valore medio dei 21 giorni precedenti). Queste due variabili spiegherebbero il 57% della variabilità della fruttosamina, in larga misura per il contributo delle albumine (49%). In questa equazione il coefficiente della variabile glucosio elaborato dal modello è risultato pari a $28,6 \pm 9,3$. Questo indicherebbe che ad un aumento di 1 mmol/l della glicemia corrisponderrebbe un aumento di 28 $\mu\text{mol/l}$ di fruttosamina.

Utilizzando come variabile dipendente la fruttosamina corretta in base al valore di albumine, utilizzando sempre i controlli di fruttosamina effettuati a 28, 35 e 42 giorni di lattazione, si è osservato che il maggiore contributo (con coefficiente positivo) è da ascrivere alle proteine totali (29%) ed al glucosio (con coefficiente positivo) (valore medio dei 7 giorni precedenti) (17%). Queste due variabili spiegherebbero il 46% della variabilità della fruttosamina. Il coefficiente del glucosio elaborato dal modello è risultato pari a $18,0 \pm 6,0$.

7.5 DISCUSSIONE

La concentrazione plasmatica di fruttosamina nel siero, una proteina glicata formata da una reazione non enzimatica irreversibile fra glucosio e proteine (principalmente le albumine), riflette la concentrazione media del glucosio delle ultime 2-3 settimane (Jensen et al., 1992). Nell'uomo, questo parametro è largamente utilizzato per monitorare la concentrazione plasmatica di glucosio nei pazienti diabetici. Anche nel cane e nel gatto molti autori hanno usato il test per la determinazione della fruttosamina per la diagnosi e il monitoraggio del diabete mellito (Reusch et al., 1993; Jensen, 1995). Relativamente pochi sono i lavori nei bovini.

Considerando le variazioni della concentrazione di fruttosamina nel sangue di bovine riportate in letteratura, notiamo che i valori di fruttosamina rilevati nella presente ricerca su bovine in fase di transizione (range 122-209 $\mu\text{mol/l}$) non sono molto differenti rispetto a quelli riportati da Ropstad (1987) per bovine da latte di razza Norvegese in fase iniziale di lattazione ($141 \pm 20 \mu\text{mol/l}$). I dati ottenuti nella nostra ricerca sono risultati viceversa inferiori rispetto a quelli del limite inferiore dell'intervallo di riferimento (213-265 $\mu\text{mol/l}$) proposto da Jensen et al. (1993) per le bovine da latte a differenti età e in diverse condizioni fisiologiche. Allo stesso tempo i nostri valori di fruttosamina trovati per il periodo pre e post parto sono risultati inferiori rispetto a quelli riportati da Ceballos et al. (2002a) ($346 \pm 220 \mu\text{mol/l}$ e $428 \pm 239 \mu\text{mol/l}$ rispettivamente). Valori più elevati sono stati riscontrati anche da Coppo (2001) in vitelli in accrescimento aventi un'età compresa tra 2 ($297 \pm 35 \mu\text{mol/l}$) e 4 mesi ($226 \pm 33 \mu\text{mol/l}$). Questi valori più elevati di fruttosamina nei vitelli sono tuttavia attesi per la più alta glicemia che caratterizza il bovino in fase di allattamento (Calamari et al., 1982; Abeni et al., 2000). Esaminando tutti questi dati possiamo evidenziare che i nostri dati, ad eccezione dei valori molto più elevati di Ceballos et al (2002a) ottenuti nelle nostre stesse fasi fisiologiche, sono in buona sintonia con la bibliografia. Nell'uomo, non è presente un range di riferimento disponibile per interpretazione dei dati di questo parametro. I valori di riferimento dipendono da diversi fattori: età del paziente, sesso, campione della popolazione e la tipologia del test che viene utilizzata. Quindi, ciascuna referto di laboratorio dovrebbe includere gli specifici range di riferimento del test.

Nella nostra ricerca, i valori più elevati di fruttosamina sono stati osservati nel controllo pre parto. Successivamente, nel controllo effettuato 7 giorni dopo il parto i valori sono risultati più bassi, con una ulteriore riduzione osservata al controllo effettuato 14 giorni dopo il parto. Dalla seconda all'ottava settimana di lattazione i valori di fruttosamina sono progressivamente aumentati, confermando i risultati ottenuti da Ropstad (1987). L'andamento medio della fruttosamina nel periparto osservato nella nostra ricerca è risultato in sintonia con quello della glicemia, con una ritardata riduzione della fruttosamina nelle prime due settimane di lattazione rispetto alla

diminuzione della glicemia. Si è osservato questo ritardo nella riduzione di fruttosamina rispetto a quella della glicemia perché il valore di fruttosamina è considerato il frutto della glicemia delle ultime 2-3 settimane (Willms & Lehmann, 1990). Quindi i valori a 7 e 14 giorni risentono anche della glicemia pre-parto ed al parto, dove i valori sono più elevati (specie nell'intorno del parto).

Per studiare più adeguatamente l'utilità della fruttosamina nel rappresentare il valore medio della glicemia delle settimane precedenti, molti autori suggeriscono di utilizzare i valori di fruttosamina in base al contenuto di albumine. Infatti, dal momento che la fruttosamina è frutto della reazione non enzimatica fra glucosio e proteine (con le albumine in particolare) si suggerisce, al fine di escluderne le interferenze e di valutare più correttamente la relazione con il glucosio, una correzione dei valori di fruttosamina in base al contenuto di albumine del plasma (Coppo, 2001). Tuttavia dalle nostre elaborazioni, pur avendo riscontrato una buona correlazione fra fruttosamina ed albumine, non abbiamo riscontrato sostanziali differenze nelle correlazioni con il glucosio calcolate sulla base della fruttosamina non corretta rispetto a quella corretta. Entrambi i valori hanno mostrato correlazioni significative in modo non sistematico nei vari controlli con la glicemia media dei 7, 14 e 21 giorni precedenti il controllo.

Una più sistematica correlazione è stata riscontrata con i valori medi di glicemia dei 21 giorni precedenti il controllo. Questo è in accordo con la letteratura, in relazione all'emivita delle albumine, gli attuali valori di fruttosamina riflettono mediamente quelli del glucosio nel plasma relativi alle tre settimane precedenti (Willms & Lehmann, 1990).

Analizzando ora le correlazioni fra fruttosamina e glicemia media delle 2-3 settimane precedenti, osservate in occasione dei vari controlli, evidenziamo che queste non sono mai risultate altamente significative e, in taluni casi (preparto e controlli dopo i primi 45 giorni di lattazione), solo debolmente significative. La più ridotta significatività osservata fra fruttosamina e glicemia nel pre parto può essere una conseguenza della ridotta variabilità della glicemia, come ipotizzato da Sorondo et al. (2009). Al contrario nel primo mese di lattazione sono osservate le maggiori variazioni della glicemia, come ampiamente noto (Commissione ASPA, 1999), così nel primo mese abbiamo riscontrato le correlazioni più elevate e sistematiche fra fruttosamina e glicemia media delle settimane precedenti il controllo.

Nei pochi lavori in bibliografia non si è osservata in tutti i casi una correlazione sistematica fra fruttosamina e glicemia nel primo mese di lattazione (Stengärde e coll., 2008; Sorondo e coll., 2009), quando le variazioni di glicemia sono normalmente di maggiore entità. L'assenza di correlazione può anche conseguire dalle difficoltà nel misurare correttamente i livelli medi di glicemia nel periodo precedente al controllo della fruttosamina, soprattutto quando i controlli vengono effettuati in allevamenti privati. Nel nostro caso, avendo operato in un allevamento

sperimentale a stabulazione fissa, i controlli possono essere più rigorosi anche in rapporto ai pasti che notevole effetto hanno sulla glicemia. Tra i fattori che possono interferire con la corretta misura del valore medio di glicemia possiamo ricordare:

- una mancata standardizzazione dei controlli in termini di momento del prelievo, di distanza dal pasto, di materiale impiegato per il prelievo e di trattamento dei campioni. Ben documentati sono infatti gli effetti del pasto (Bertoni, 1985b). Nella nostra ricerca i prelievi sono sempre stati effettuati alla stessa ora, prima della distribuzione del pasto mattutino. Inoltre i campioni, raccolti in provette con Li-eparina come anticoagulante, sono stati tenuti in acqua e ghiaccio fino al momento della separazione del plasma (in centrifuga refrigerata) avvenuta entro 30-60' dopo il prelievo. Molti di questi fattori influenzano la glicemia ma non i valori di fruttosamina. Infatti la concentrazione di fruttosamina non è influenzata dalle oscillazioni acute di glucosio nel plasma e non mostra variazioni diurne significative nel bovino (Jensen et al., 1993) nel cane (Marca et al., 2000);
- lo stress connesso con la cattura, il contenimento dell'animale ed il successivo prelievo di sangue. Nel nostro caso gli animali in stabulazione fissa non richiedevano la cattura ed erano molto "allenati" ai prelievi di sangue (Commissione ASPA, 2009). Anche in questo caso lo stress acuto influenzerebbe la glicemia ma non la fruttosamina. Viceversa la fruttosamina può risentire dello stress cronico (Tahara et al., 1995);
- un ridotto numero di rilievi per il calcolo del valore medio di glicemia delle 2-3 settimane precedenti il controllo della fruttosamina. Nel nostro caso i prelievi venivano effettuati ogni 2-3 giorni e, nella settimana precedente e successiva al parto quando le variazioni di glucosio sono più importanti, venivano effettuati giornalmente.

Dalle ricerche condotte nell'uomo sulla emoglobina glicata e sulla fruttosamina si sono ottenute equazioni per calcolare il valore di emoglobina glicata e di fruttosamina a partire dalla glicemia. In base a queste ricerche si è proposto che ad un aumento di glicemia di 1 mmol/l corrisponde un aumento di 22,7 $\mu\text{mol/l}$ di fruttosamina (Bartol, 2000).

Dalla elaborazione dei nostri dati mediante regressione fra fruttosamina e valore medio della glicemia dei 21 giorni precedenti, abbiamo evidenziato che per ogni incremento di 1 mmol/ del glucosio medio del plasma dei 21 giorni precedenti il controllo, si ha un aumento di circa 31 $\mu\text{mol/l}$ di fruttosamina (valore non corretto per le albumine). Il valore è di poco inferiore (28 $\mu\text{mol/l}$) quando si considera la fruttosamina corretta in base al contenuto di albumine. Questi valori sono superiori rispetto a quelli suggeriti da Bartol (2000). Valori molto simili a questo dato proposto in letteratura sono stati da noi riscontrati quando si elaborano i dati considerando i valori di glicemia dei 7 e 14 giorni precedenti il controllo. Infatti considerando la fruttosamina corretta per le

albumine, abbiamo osservato un valore di 23,9 $\mu\text{mol/l}$ quando si considera la glicemia dei 14 giorni precedenti ed un valore di 23,5 $\mu\text{mol/}$ quando si considerano solo 7 giorni. Queste differenze sembrano indicare che i valori di glicemia osservati 3 settimane prima avrebbero un minore peso sul valore attuale di fruttosamina rispetto ai valori osservati nei soli ultimi 14 giorni precedenti.

Nella nostra ricerca i valori di fruttosamina hanno mostrato deboli correlazioni positive con il bilancio energetico della razione. I livelli di fruttosamina hanno mostrato una debole correlazione positiva con il grado di copertura del fabbisogno energetico (valore medio delle tre settimane precedenti il controllo) solo nel primo mese della lattazione. A conferma di queste correlazioni, ci sono anche quelle negative fra i valori di fruttosamina rilevati fra la quarta e la sesta settimana di lattazione con il calo di BCS (come differenza, espressa in valore assoluto, fra BCS pre parto e BCS dopo 60 giorni di lattazione). In base alle correlazioni positive osservate fra fruttosamina ed ingestione si può presupporre che il deficit energetico sia stato maggiormente influenzato dalla riduzione dell'ingestione piuttosto che da un aumento dei fabbisogni per effetto della maggiore produzione; infatti la fruttosamina ha mostrato una scarsa correlazione positiva con la produzione rilevata nelle 2-3 settimane precedenti il controllo. Inoltre, l'aver riscontrato una correlazione positiva fra il livello medio di fruttosamina a 4-6 settimane di lattazione con l'ingestione rilevata ad una settimana prima del parto, lascia presupporre che l'andamento del bilancio energetico nel puerperio risulti condizionato dall'ingestione pre parto. In precedenti ricerche dell'Istituto di Zootecnica si era evidenziata l'importanza dell'ingestione nel pre parto, in particolare l'entità della sua riduzione in questa fase fisiologica risultava principalmente influenzata da fenomeni di tipo infiammatorio (Trevisi e coll., 2007). Tali risultati vengono confermati nella nostra ricerca in quanto gli animali appartenenti al gruppo della fruttosamina bassa, che erano quelli che avevano mostrato una riduzione più marcata della sostanza secca ingerita nel pre parto, hanno mostrato valori di ceruloplasmina e aptoglobina più elevati con l'approssimarsi del parto ad indicare la presenza di fenomeni di tipo infiammatorio durante questo periodo.

Come indicato in precedenza la fruttosamina è frutto della reazione enzimatica irreversibile fra il glucosio e le proteine, in particolare delle albumine. Anche le albumine, al pari del glucosio, sono risultate positivamente correlate con la fruttosamina nel corso del primo mese della lattazione, in accordo con quanto riportato da Kaneko e coll. (1992). A differenza di quanto riportato da Kaneko e coll. (1992), nella nostra ricerca è stata evidenziata una correlazione molto debole fra fruttosamina e proteine totali, mentre non è stata evidenziata alcuna correlazione con le globuline. Dalla bibliografia emerge, in generale, una correlazione fra fruttosamina e proteine totali più debole rispetto a quella con le albumine. Si ritiene infatti che le albumine contribuiscano per circa l'80% alla formazione della fruttosamina (Johnson et al., 1982; Kennedy, 1992). Kawamoto et al. (1992)

non hanno osservato correlazioni fra fruttosamina e proteine totali in cani diabetici. Ropstad (1987) non ha riscontrato correlazioni fra fruttosamina e proteine totali in bovine all'inizio della lattazione. Nell'uomo, Das et al. (1992) hanno trovato una più modesta correlazione con le proteine rispetto a quella con le albumine. Ugualmente una relazione lineare è stata osservata da Fluckiger et al. (1987).

Poco indagata è la correlazione fra fruttosamina e globuline, anche se sono state riscontrate differenze fra specie; infatti Reush et al. (2001), accanto ad una riduzione della fruttosamina negli animali con ipoproteinemia, hanno riscontrato nel cane una correlazione della fruttosamina con le albumine ma non con le globuline; al contrario nel gatto la correlazione si è osservata con le globuline ma non con le albumine. Sembrerebbe che nel cane il glucosio si leghi primariamente con le albumine e nel gatto con le globuline. E' probabile quindi che nel cane le albumine abbiano più gruppi amminici della lisina rispetto alle globuline. I nostri risultati sembrerebbero più in accordo con quelli riscontrati nel cane.

Con la regressione multipla, utilizzando la fruttosamina come variabile dipendente e selezionando le variabili del sangue e della razione mediante la procedura stepwise, si è sempre osservata in tutti i modelli elaborati (prendendo in esame diversi periodi), l'inclusione delle variabili albumine e glicemia. Queste due variabili spiegavano mediamente dal 50 al 57% della variabilità della fruttosamina. Il contributo della albumine è sempre stato di poco inferiore al 50%. Le altre variabili selezionate dalla procedura stepwise hanno fornito un contributo largamente inferiore rispetto al contributo della albumine e del glucosio. Fra queste variabili si può includere il grado di copertura del fabbisogno di energia sia come valore rilevato in concomitanza con il controllo della fruttosamina e sia come valore medio di tutti i rilievi effettuati nei 7, 14 e 21 giorni precedenti.

Dall'esame dei risultati ottenuti con la suddivisione degli animali in tre gruppi, suddivisione effettuata sulla base dei valori di fruttosamina (media dei livelli osservati a 28, 35 e 42 DIM), abbiamo riscontrate le attese differenze in termini di concentrazione di glucosio e di albumine nel plasma. Infatti gli animali del gruppo fruttosamina bassa (FB) hanno mostrato valori mediamente più bassi di glucosio e di albumine rispetto al gruppo fruttosamina alta (FA). Nel gruppo intermedio (FI) si sono osservati, per il glucosio, valori talvolta più prossimi a quelli del gruppo FA e talvolta a quelli del gruppo FB. Per le albumine i valori di FI sono risultati sempre molto prossimi a quelli del gruppo FA.

Le differenze osservate in termini di glicemia sono in sintonia con il bilancio energetico della razione. Si è infatti osservato una più alta copertura dei fabbisogni energetici in FA rispetto ad FI ed FB. In questi due gruppi, nonostante la pressoché identica copertura del fabbisogno energetico nel corso del periodo controllato, si è osservata una maggiore riduzione del BCS in FB rispetto ad FI.

Questo lascia presupporre che nel gruppo FB vi sia stata una minore utilizzazione degli alimenti e/o un aumento dei fabbisogni rispetto ai valori teorici. In nostre precedenti ricerche si è osservato che l'efficienza nell'utilizzazione dell'energia degli alimenti si riduce in animali con problemi infettivo-infiammatori (Trevisi e coll., 2007). Nel gruppo FB si è osservata una maggiore alterazione di alcune proteine negative e positive di fase acuta che potrebbero avvalorare l'ipotesi di un aumento dei fabbisogni teorici e di una minore utilizzazione degli alimenti.

Infatti nel gruppo FB, oltre ai valori più bassi di albumine, abbiamo riscontrato un aumento più lento del colesterolo nel post parto. Un più lento aumento di colesterolo ematico può essere indice di minori sintesi epatiche di lipoproteine. Infatti il colesterolo è principalmente influenzato dalle lipoproteine circolanti e la sua variazione dipende largamente dalla quantità di lipidi mobilizzati e che sono riesterificati ed inclusi nelle lipoproteine a densità molto bassa da parte del fegato (Puppione, 1978). Dal momento che il maggiore calo di BCS osservato in FB indicherebbe una maggiore lipomobilizzazione in questi soggetti, il più lento aumento del colesterolo conseguirebbe ad una più ridotta capacità del fegato nella sintesi delle lipoproteine a densità molto bassa. Nelle condizioni di tipo infiammatorio, le citochine pro-infiammatorie riducono la sintesi delle proteine negative di fase acuta, ed alcune di queste sono importanti per il normale metabolismo epatico. Per esempio la riduzione della apolipoproteina B100 potrebbe aumentare il rischio di lipidosi per una minore capacità del fegato di immettere in circolo gli acidi grassi riesterificati (Itoh et al., 1997), secondo Gruffat et al. (1997) la lattifera produrrebbe una minore quantità di apolipoproteina B100, mentre in realtà pare più logico pensare che ciò si debba alla elevata frequenza di fatti infiammatori nel pre parto (Cappa e coll., 1989; Bertoni e coll., 2008).

Infine i livelli di colesterolo nel plasma sono influenzati anche dalla quantità di grassi ingeriti (Commissione ASPA, 1999). Nel nostro caso, dal momento che l'andamento del contenuto di lipidi grezzi della razione è risultato simile nei tre gruppi di animali nel corso delle prime settimane di lattazione, queste differenze si identificano con la diversa ingestione di s.s. La minore ingestione di s.s. nelle bovine FB potrebbe aver contribuito all'aumento più lento di colesterolo osservato in questi animali.

Tra le proteine positive di fase acuta abbiamo riscontrato un aumento di aptoglobina, nella prima settimana post parto, più lieve e transitorio in FI. In FB l'aumento di aptoglobina nel post parto è risultato analogo a quello osservato in FA; tuttavia in FB si è osservato un nuovo aumento di aptoglobina in due animali su quattro anche fra i 14 e 20 giorni di lattazione. Anche i valori di Zn sono risultati inferiori nel gruppo FB. Questi valori più bassi, tenuto anche conto degli apporti con la razione analoghi in tutti gli animali, potrebbero essere una conseguenza della sintesi della Zn-metallotionenina, sintesi stimolata dalle condizioni di tipo infiammatorio (citochine) porterebbe ad

una riduzione del tasso plasmatico di zinco per ridurre sensibilmente la moltiplicazione batterica che richiede anche la presenza di zinco (Beisel e coll., 1974).

La classificazione degli animali in base ai valori di fruttosamina (media dei valori osservati a 28, 35 e 42 DIM) è risultata in buona sintonia con i valori di LAI. In nostre precedenti ricerche avevamo evidenziato che suddividendo gli animali dell'allevamento in base al LAI, dopo aver escluso gli animali con gravi problemi sanitari, nel gruppo caratterizzato dai più bassi valori di LAI venivano inclusi gli animali che avevano avuto nel puerperio maggiori problemi sanitari, che producevano meno latte, che presentavano una maggiore perdita delle condizioni nutrizionali (maggiore riduzione del BCS) e che avevano manifestato maggiori problemi riproduttivi (Trevisi et al., 2007). Sempre in questi animali con LAI più basso, si è osservato un quadro metabolico alterato con un aumento delle proteine positive di fase acuta ed una riduzione di quelle negative, alterazioni osservate anche negli animali dove non sono stati evidenziati problemi sanitari manifesti. Tutti questi rilievi lasciano presupporre minori condizioni di benessere negli animali con valori di LAI più bassi.

7.6 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'aver osservato una buona relazione fra fruttosamina a 28-42 DIM e LAI può essere riconducibile a diversi aspetti: la fruttosamina, misurata al termine del primo mese di lattazione, offre la possibilità di compiere un'analisi retrospettiva del bilancio energetico non tanto per effetto dell'elevata produzione, ma per la riduzione di ingestione e minore efficienza che possono derivare dalla presenza di fenomeni infettivo-infiammatori, confermati dalla riduzione delle proteine negative di fase acuta e dalla presenza di ridotti valori di LAI. Tale condizione comporta quindi un minor benessere degli animali.

Nella nostra ricerca i problemi sanitari sono stati nel complesso di modesta entità ed i casi clinicamente manifesti (una mastite ed un evento febbrile) si sono osservati solo negli animali con fruttosamina bassa. La più evidente alterazione dei parametri connessi con gli eventi di tipo infiammatorio negli animali con fruttosamina bassa conferma che in questi animali vi sono stati altri problemi non manifesti o che le bovine hanno risposto in maniera meno favorevole all'infiammazione.

CAPITOLO 8

“RISPOSTA ALLACORTICOTROPINA IN BOVINE IN FASE INIZIALE DI LATTAZIONE ED EFFETTI DEI FENOMENI INFIAMMATORI.”

8.1 SCOPO

Si è rilevato in precedenza di quanto sia difficile sorprendere le condizioni di stress cronico; non è infatti chiaro come si comporta il livello della cortisolemia. Così molti ricercatori ritengono che le bovine stressate cronicamente presentino una iper reattività della corteccia surrenale (Broom, 1988; Manteca, 1998), per cui la risposta ad un *challenge* (stress acuto) può essere più elevata in essi. Altri autori invece (Hasegawa e coll., 1997) asseriscono che in un animale stressato cronicamente si ha un livello di cortisolo basale più elevato, ma una minore risposta all'ACTH (quindi durante un challenge). A complicare le cose, vi sono i numerosi fattori che possono influenzare la cortisolemia sia basale che dopo challenge e tra questi si ricordano: il ritmo circadiano (Möstl e Palme, 2002), prelievo (Negrão et al., 2004), cattura (Bertoni et al., 2005a), la mungitura (Bertoni et al., 2005a; Rushen et al., 2007); grado di abitudine dell'animale (von Borrell, 2001; Smith e Dobson, 2002).

A tutto ciò consegue che in ogni caso (cortisolo basale o *challenge* con ACTH) è necessario che siano meglio chiariti i fattori che influiscono sul livello di cortisolo nel plasma. Tra quelli fisiologici, di particolare rilevanza paiono sia il livello di transcortina circolante (Greenspan et al., 1986) che la condizione infiammatoria, specialmente nel periparto (Bionaz, 2007; Bertoni et al., 2008).

Pertanto, lo scopo della ricerca è stato quello di studiare le variazioni del cortisolo in bovine in fase iniziale di lattazione e sottoposte ad un *challenge* con una bassa dose di ACTH; inoltre di valutare se vi sia una relazione fra tali variazioni e la condizione infiammatoria post parto valutata in base alle sue conseguenze sull'attività di sintesi epatica.

8.2 MATERIALI E METODI

La prova si è svolta presso un allevamento privato ubicato nel comune di Carpaneto Piacentino (PC). L'allevamento era costituito da circa 500 capi di cui 220 bovine in lattazione ed era iscritto all'Associazione Provinciale Allevatori di Piacenza.

Gli animali erano allevati in un ricovero a stabulazione libera ed erano suddivisi in gruppi sulla base del ciclo produttivo. La stalla era suddivisa in 2 aree, servite da 2 corsie di alimentazione. La prima area, caratterizzata dalla zona di riposo con lettiera permanente, includeva 4 box: il box infermeria, che ospitava le bovine in lattazione affette da varie patologie, il box delle bovine in asciutta, dove avveniva anche il parto, e due box in cui erano alloggiate le bovine in *steaming-up* e le manze gravide. La seconda era costituita da due grandi box, caratterizzati dalla presenza di cuccette, ospitanti le bovine in fase iniziale, intermedia e avanzata della lattazione. Ogni area era dotata di un sistema di raffrescamento costituito da ventilatori abbinati a nebulizzatori nella zona di alimentazione e da soli ventilatori nella zona di riposo. Il ricovero era privo di paddock esterno. La zona di alimentazione si caratterizzava per un numero di posti in mangiatoia pari al numero di capi allevati; ugualmente il numero di cuccette nel reparto delle vacche in lattazione era pari al numero di capi allevati.

Le bovine erano sottoposte a 2 mungiture quotidiane ad intervalli di 12 ore (con inizio al mattino alle ore 3:00 e al pomeriggio alle 15:00) in una sala di mungitura con impianto a giostra da 22 posti, dotata di un sistema di controllo automatico della produzione (Alpro, Delaval, Tumba, Sweden) e stacco automatico del gruppo mungitore a fine mungitura. La sala di attesa antistante la sala di mungitura aveva una superficie di 80 m², inoltre un tratto di corridoio posto nei pressi della sala di mungitura fungeva anch'esso da sala di attesa.

Gli alimenti venivano somministrati mediante tecnica *unifeed*, in un'unica distribuzione giornaliera effettuata tra le 7:00 e le 8:00 del mattino per le bovine in lattazione dopo la pulizia e la rimozione dalla mangiatoia di eventuali residui di alimenti.

La composizione dell'*unifeed* distribuito agli animali durante il periodo dell'asciutta, al momento dello *steaming up* e nella successiva lattazione nel corso di tutta la prova sperimentale è illustrata in Tabella 1.

Tabella 1. Composizione della miscela *unifeed* distribuita agli animali nelle diverse fasi del ciclo produttivo durante la prova sperimentale (espressa in percentuale sulla sostanza secca).

Alimenti	Asciutta	Steaming-up	Lattazione
Sostanza secca ingerita (kg)	10,74	10,56	20,9
Fieno di graminacee	27,69	24,65	4,44
Fieno di leguminose	21,40	17,42	19,80
Silomais	33,60	19,92	32,09
Pastone di mais		5,72	10,52
Paglia	17,30	14,08	
Acqua		0,09	0,10
Glicole		0,65	1,23
Mais granella		5,89	10,64
Integratore minerale (Na-ca-mg fosfato idrato)		0,37	0,66
Nucleo *		12,28	
Nucleo 1 **			22,48

* = composizione chimica del nucleo utilizzato durante lo steaming up: proteina greggia 33%; lipidi greggi 5%; fibra greggia 9,9%; ceneri gregge 10,5%.

** = composizione chimica del nucleo utilizzato durante la lattazione: proteina greggia 17,5%; lipidi greggi 3%; fibra greggia 5,4%; ceneri gregge 9,4%.

In tutti i box, gli animali avevano libero accesso all'acqua di abbeverata mediante l'utilizzo di abbeveratoi a vaschetta (n = 6 per le bovine in lattazione, delle dimensioni di 120 cm di lunghezza e 35 cm di profondità) (n = 5 per le asciutte e le manze delle dimensioni di 50 cm di lunghezza e 30 cm di profondità.) e abbeveratoi individuali (n = 5 presenti sia nel box delle manze, che in quello delle asciutte).

Per la prova sperimentale sono state utilizzate 23 bovine pluripare in fase iniziale di lattazione (34 ± 4 DIM) di razza Frisona Italiana. Dopo il parto, tutti gli animali sono stati monitorati per lo stato di salute e la produzione di latte giornaliera. A 7 e 14 DIM sono stati eseguiti prelievi ematici dalla vena giugulare utilizzando la tecnica Vacutainer avvalendosi di provette contenenti eparina di litio come anticoagulante (Terumo Europe, Lovanio, Belgio) prima della distribuzione della miscelata. Subito dopo il prelievo, i campioni di sangue sono stati posti in contenitore contenente acqua e ghiaccio e trasportati nel laboratorio situato presso l'Istituto di Zootecnica entro un'ora dal prelievo stesso. All'arrivo in Istituto è stato misurato l'ematocrito utilizzando microematocitocitrometro su di un'aliquota di sangue intero centrifugata a 15.000 g per 10 minuti.

La restante frazione di sangue intero è stata centrifugata (3.500 g per 16 minuti ad una temperatura pari a 6°C) ed il plasma è stato separato e suddiviso in quattro aliquote che sono state congelate a -20°C prima di essere analizzate. Le determinazioni analitiche sono state eseguite mediante

l'utilizzo di analizzatore automatizzato (ILAB 600, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA) a temperatura pari a 37°C.

Sui campioni di plasma sono stati determinati i seguenti parametri: glucosio (mmol/l), colesterolo (mmol/l), vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$), vitamina E ($\mu\text{g}/\text{ml}$), beta-carotene ($\text{mg}/100\text{ ml}$), urea (mmol/l), calcio (mmol/l), fosforo (mmol/l), magnesio (mmol/l), sodio (mmol/l), potassio (mmol/l), cloro (mmol/l), zinco ($\mu\text{mol}/\text{l}$), ceruloplasmina ($\mu\text{mol}/\text{l}$), proteine totali (g/l), albumine (g/l), globuline (g/l), aspartato-aminotransferasi (AST or GOT) (U/l), glutamil - transferasi (GGT) (U/l), bilirubina ($\mu\text{mol}/\text{l}$), fosfatasi alcalina (U/l), aptoglobina (g/l), acidi grassi non esterificati (NEFA) (mmol/l), creatinina ($\mu\text{mol}/\text{l}$), beta-idrossibutirrato (βOHB) (mmol/l), metaboliti reattivi all'ossigeno (ROMt ($\text{mg di H}_2\text{O}_2 /100\text{ ml}$); acido sialico (mg/ml), gruppi tiolici (SHp) ($\mu\text{mol}/\text{l}$), paraoxonasi(PON) (U/ml), metaboliti dell'ossido nitrico (NOx) ($\mu\text{mol}/\text{l}$); nitriti (NO_2) ($\mu\text{mol}/\text{l}$); nitrati (NO_3) ($\mu\text{mol}/\text{l}$).

Tutte le metodiche per la determinazione di questi parametri sono illustrate in Appendice.

Al termine del primo mese di lattazione e più precisamente al 34° (± 4) giorno di lattazione (DIM), ogni animale è stato sottoposto ad un *challenge* con un analogo sintetico della corticotropina (ACTH), tetracosactide o ACTH₁₋₂₄ (Synacthen, Novartis Pharma AG, Stein, CH). Ciascuna bovina ha ricevuto una somministrazione endovenosa pari a 20 μg (2 U.I. di ACTH) di Synacthen, diluito in 2 ml di soluzione fisiologica, utilizzando un protocollo precedentemente applicato in altre ricerche (Trevisi et al., 2007).

In particolare, la procedura ha avuto inizio con i prelievi di sangue dalla giugulare eseguiti 3 ore dopo la distribuzione del pasto evitando ogni operazione che potesse determinare una condizione di stress negli animali; quindi si è proceduto alla iniezione di ACTH (tempo 0) e nuovamente prelievo di sangue esattamente a 30 e a 60 minuti dopo l'iniezione. I prelievi sono stati eseguiti con le stesse modalità descritte precedentemente. Successivamente all'iniezione gli animali sono stati mantenuti nella rastrelliera autocatturante per il tempo necessario con *unifeed* a disposizione e sono stati osservati per valutare la presenza di eventuali reazioni avverse negli animali. I campioni di sangue sono stati trattati con la stessa metodica prima descritta.

Sui 3 campioni relativi al *challenge* con Synacthen (tempo 0, 30 e 60 minuti dopo l'iniezione) si è proceduto invece alla determinazione di: ematocrito, NEFA (mmol/l); βOHB (mmol/l). urea (mmol/l) e cortisolo (ng/ml).

Successivamente sugli animali utilizzati per la prova di *challenge* è stata effettuata una ispezione con la valutazione delle condizioni nutrizionali e dello stato sanitario. Tali valutazioni sono state effettuate mediante una serie di osservazioni a livello di aspetto esteriore, come previsto dal modello SDIB di valutazione del benessere animale messo a punto dall'Istituto di Zootecnica. Nello specifico sono stati valutati: lo stato d'ingrassamento o Body Condition Score (BCS, ADAS, 1986);

la valutazione del grado di ipercheratosi della punta dei capezzoli mediante l'esecuzione del *Teat Score* (Mein et al., 2001); lo stato di arti e piedi con la registrazione di eventuali problemi podali e di lesioni/gonfiori agli arti, lo stato di pulizia degli animali, valutato mediante l'applicazione del *Cleanliness Score* (Faye e Barnouin, 1985); inoltre, sono stati annotati anche eventuali problemi clinici (mastiti lesioni, gonfiori, muco nasale, lacrimazione e la presenza di ectoparassiti). Le schede per la spiegazione e l'esecuzione dei punteggi sono illustrate in Appendice.

8.3 ANALISI STATISTICA

Le bovine sono state suddivise in 4 gruppi in funzione della loro attività epatica valutata per mezzo di un indice complesso chiamato LAI (Liver Activity Index, Trevisi e coll., 2001) calcolato sulla base dei risultati delle analisi effettuate sui campioni di sangue prelevati nel corso del primo mese di lattazione. La procedura per il calcolo del suddetto indice è stata ampiamente illustrata nella precedente prova sperimentale.

Sulla base di questa modalità di calcolo, i valori elevati di LAI indicano una buona funzionalità epatica, mentre quelli bassi una sua "ridotta funzionalità"; in questa ultima condizione si determina quindi un aumento della produzione delle proteine positive di fase acuta (come ad esempio: la proteina C reattiva, l'aptoglobina, la ceruloplasmina, le globuline) a discapito di quelle negative (come ad esempio: le albumine, le apolipoproteine (Bruss, 1997) e le proteine vettrici di ormoni, la *retinol binding protein* (Fleck, 1989) che assicurano le comuni funzioni del fegato.

Pertanto sulla base dei risultati ottenuti le bovine, dopo averle ordinate in base ai valori di LAI, sono state suddivise in 4 gruppi o quartili: LO (bovina con un basso valore di LAI), IN-LO e IN-UP (bovine con un valore intermedio di LAI), UP (bovine con un elevato valore di LAI).

Sulla base di questa suddivisione gli animali sono risultati omogenei per numero di parti, BCS e produzione come riportato in Tabella 2.

Tabella 2. Caratteristiche e performance degli animali suddivisi in quartili sulla base dell'indice LAI (Liver Activity Index) utilizzati durante la sperimentazione.

		LO	IN-LO	IN-UP	UP	ES
DIM	(d)	34	34	33,8	35	1,786
PARTI	(n°)	3,83	3,83	2,80	3,17	0,421
BCS		2,26	2,16	2,19	2,03	0,105
LAI		-0,72	-0,18	0,33	0,62	0,077
produzione 14	kg/d	27,1	33,0	34,0	36,1	2,162
produzione 35	kg/d	33,8	38,1	38,2	37,5	2,435

L'elaborazione statistica è stata effettuata sui parametri ematici rilevati a 7, 14 e 34 DIM, 34 DIM (30 min) e 34 DIM (60 min) mediante Analisi della Varianza per osservazioni ripetute, procedura MIXED del SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC; release 9.1). Nel modello statistico sono stati considerati come fattori di classificazione fissi il gruppo (UP, IN-UP, IN-LO, LO); i DIM (7, 14 e 34) e l'interazione tra il gruppo e i DIM; mentre come fattore casuale individuale è stata considerata la bovina entro gruppo (n = 6 per il gruppo UP, n = 5 per quello IN-UP, n = 6 per quello IN-LO e n = 6 per quello LO). L'analisi è stata effettuata utilizzando la struttura di covarianza *Autoregressive* che è risultata la più efficace dopo confronto con altre strutture di covarianza mediante dell'esecuzione dei Test Akaike e Schwarz Bayesian.

Prima dell'analisi statistica si è proceduto alla verifica della normalità per ciascun parametro mediante il test di Shapiro Wilks (SAS Inst. Inc., Cary, NC; release 9.1) e, quando necessario, i dati sono stati normalizzati mediante trasformazione logaritmica. In aggiunta, sono state calcolate le correlazioni di Pearson (SAS Inst. Inc., Cary, NC; release 9.1) tra i parametri ematici all'interno di ciascun gruppo o quartile. Nei risultati è stata riportata la significatività quando $P < 0.05$ e i dati non trasformati per tutti i parametri.

I parametri ematici sono stati inoltre sottoposti all'analisi delle componenti principali (procedura PRINCOMP del SAS, (SAS Inst. Inc., Cary, NC; release 9.1) in maniera separata per i dati ottenuti da ogni fase della lattazione (7, 14 e 34 DIM), utilizzando come variabili tutti i parametri ematici analizzati (ad eccezione del cortisolo). I valori ottenuti delle prime tre componenti sono stati correlati sia con i valori del cortisolo basale che con quelli della risposta integrata (area sotto la curva, AUC) in 60 minuti al trattamento con ACTH a 34 DIM.

8.4 RISULTATI

Come già mostrato nel capitolo “Materiali e Metodi” (Tabella 1), la razione somministrata agli animali (espressa sulla sostanza secca) sottoposti alla prova Synacthen durante il primo mese di lattazione era costituita da: 4,4% fieno di graminacee; 19,80 % fieno di medica; 32,09 % di silomais; 10,52 % di pastone integrale di mais; 1,23 % di glicole propilenico; 10,64 % di farina di mais; 0,66 % di integratore minerale e 22,48% di mangime.

Sulla base di tale composizione, le caratteristiche chimiche degli alimenti sono state stimate secondo la metodologia proposta dal modello SDIB (Calamari e Bertoni, 2009). Confrontando tali caratteristiche con i valori ottimali per tale categoria (Calamari e Bertoni, 2009), si evince che il tenore in proteine grezze e quello in NDF erano prossimi a quelli consigliati (rispettivamente 16,59% vs 16,65% e 33,78% vs 33%); mentre quello in amido era leggermente superiore rispetto a quello raccomandato (25,71% vs 24,70%), l’apporto energetico, espresso in termini di Unità Foraggiere Latte (UFL), è risultato pari a 0,91 su kg di sostanza secca ingerita, livello non particolarmente elevato per la fase di lattazione.

Per quanto riguarda le principali caratteristiche controllate sulle bovine oggetto della prova sperimentale si procederà ad un loro commento sulla base della loro suddivisione in quartili operata con l’indice dell’attività epatica LAI, precedentemente descritto da Bertoni et al., 2008. Per quanto riguarda il numero di parti e il Body Condition Score (ADAS, 1986), valutato quest’ultimo al 34° giorno di lattazione, non hanno mostrato differenze significative tra i quattro gruppi di animali. Il BCS tuttavia, è risultato piuttosto basso in tutti e quattro gruppi e ha mostrato un valore medio pari a 2,14 punti.

Analizzando i risultati ottenuti dalla valutazione delle condizioni nutrizionali e dello stato sanitario ottenuta con alcuni rilievi previsti nel modello SDIB eseguita sugli animali utilizzati nella prova è stato osservato che: lo stato di pulizia degli animali, valutato secondo il metodo del “Cleanliness Score” previsto dal modello SDIB, è risultato elevato (100/100) in tutti gli animali della prova. Relativamente alla valutazione sanitaria della mammella, si è evidenziato che il punteggio complessivo è risultato piuttosto elevato 72,2/100, nonostante sia stato penalizzato dal contenuto in cellule somatiche nel latte, che è risultato pari a 320.000/mL nel latte di massa.

Anche il punteggio relativo alla valutazione degli arti e dei piedi è risultato elevato in tutte le bovine e pari a 87,65/100. Per tale aspetto ci si è avvalsi di più score: il “Foot Score”, punteggio fondato sull’appoggio più o meno perfetto (sino al non appoggiare per nulla un arto) dei quattro piedi; di una valutazione dei problemi traumatici od infiammatori endogeni del piede, del “Trimming Score”, che valuta la regolarità dell’appoggio in relazione al consumo spontaneo od al pareggio degli unghioni; la presenza di eventuali ferite, lesioni, gonfiori ecc. a garretti e ginocchio.

Il livello produttivo delle bovine appartenenti al gruppo LO (quelli cioè con il più basso valore di indice LAI), riscontrato al 34° giorno dal parto, è risultato inferiore rispetto a quello degli altri tre gruppi (33,8 vs. 37,9 kg/d, $P < 0,01$).

Il punteggio complessivo relativo allo stato sanitario degli animali utilizzati nel corso della prova è risultato elevato e pari a 81,64/100; il gruppo degli animali appartenenti al gruppo LO è stato però caratterizzato dalla maggiore frequenza di problemi infiammatori nel corso del primo mese di lattazione (67%).

Di seguito vengono descritti gli andamenti dei parametri ematici (quelli inclusi nell'indice LAI, ma anche quelli relativi al metabolismo energetico-proteico, all'attività epatica, alla risposta infiammatoria, i marcatori dello stress ossidativo ed ai minerali), valutati nel corso dei primi 34 giorni di lattazione nei quattro gruppi di animali suddivisi in quartili sulla base dell'indice della funzionalità epatica LAI (Liver Activity index): LO (quartile peggiore), IN-LO (quartile intermedio basso) IN-UP (quartile intermedio alto) e UP (quartile migliore). Inoltre si descriveranno le differenze riscontrate nel corso del *challenge* con ACTH (i parametri ematici valutati successivamente a tale trattamento sono stati ematocrito, glucosio, NEFA, β OHB, urea e cortisolo. Quest'ultimo è stato valutato anche qualche attimo prima del *challenge* con ACTH, momento 0).

Per semplificare la presentazione dei risultati, sono state riportate solo le differenze significative tra il gruppo LO e gli altri.

Parametri ematici costituenti l'indice LAI

Tale indice è basato sulle variazioni di colesterolo, albumina e vitamina A nel primo mese di lattazione (Trevisi et al., 2001) e ha mostrato i seguenti valori medi: $-0,63 \pm 0,17$ e $0,56 \pm 0,13$ rispettivamente per il gruppo di bovine LO (bovine appartenenti al quartile con una attività epatica più bassa) e UP (bovine appartenenti al quartile con una attività epatica più alta); $-0,21 \pm 0,13$ e $0,29 \pm 0,13$ per il gruppo INLO (bovine appartenenti al quartile intermedio inferiore) e INUP (bovine appartenenti al quartile intermedio superiore).

Nella Tabella 2 sono riportate le medie relative all'andamento delle concentrazioni plasmatiche dei parametri che compongono l'indice dell'attività epatica LAI (Liver Activity Index) nel primo mese di lattazione degli animali controllati nel corso della prova sperimentale raggruppati nei quartili di LAI.

Tabella 2. Andamento medio (e errore standard) delle concentrazioni plasmatiche di Colesterolo, Albumine e Vitamina A valutate a 7, 14 e 34 DIM in bovine suddivise in quartili in base al loro LAI (Liver Activity Index) calcolato nel primo mese di lattazione: LO (quartile inferiore) e UP (quartile superiore). Il confronto statistico è riportato solo tra il gruppo LO e gli altri tre, e l'eventuale significatività è riportata sulla destra delle medie (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$).

Parametro	DIM	LO	IN-LO	IN-UP	UP	PES¹
Colesterolo (mmol/l)	7	1,92	2,07	2,60	*	2,36
	14	2,46	2,57	3,28	*	2,85
	34	3,58	3,86	4,66	*	3,96
Albumine (g/l)	7	33,87	35,28	35,33		37,30 **
	14	34,24	35,67	35,20		38,44 **
	34	33,06	35,64	*	36,24 **	37,39 **
Vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	7	23,43	32,64	*	43,78 **	45,96 **
	14	26,40	38,67	**	45,66 **	53,27 **
	34	42,25	44,64		56,88 **	63,46 **

¹PSE= pooled standard error.

Come ovvio, le bovine appartenenti al gruppo LO hanno mostrato il più basso valore di colesterolo durante tutto il primo mese di lattazione rispetto a quelli osservati negli altri tre quartili di animali. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) sono state riscontrate tra gli animali del gruppo LO e quelli del gruppo IN-UP.

La concentrazione plasmatica di albumine è risultata pressoché costante durante tutto il primo mese di lattazione entro ciascun quartile. Anche per questo parametro, il gruppo LO ha mostrato la concentrazione plasmatica più bassa rispetto a quella degli altri tre quartili. Differenze statistiche significative tra i quartili si sono evidenziate a 7, 14 e 34 ($P < 0,05$ e $P < 0,01$) giorni di lattazione tra LO ed UP, ma anche tra LO e INLO ($P < 0,05$) e LO e INUP ($P < 0,01$) al 34° giorno.

Considerando la concentrazione plasmatica di Vitamina A si sono evidenziate differenze significative tra LO e gli altri tre quartili a 7, e a 14 ($P < 0,01$), e tra LO e UP ($P < 0,05$) a 34 giorni di lattazione.

Parametri del Metabolismo energetico -proteico

Nella Tabella 3 sono riportate le medie relative all'andamento delle concentrazioni plasmatiche dei parametri del metabolismo energetico-proteico dei controlli effettuati nel primo mese di lattazione nelle bovine suddivise in quartili di LAI.

Tabella 3. Andamento medio (e errore standard) delle concentrazioni plasmatiche di Glucosio, NEFA, β OHB, Urea e Creatinina valutato a 7, 14 e 34 DIM in bovine suddivise in quartili in base al loro LAI (Liver Activity Index) calcolato nel primo mese di lattazione: LO (quartile inferiore) e UP (quartile superiore). Il confronto statistico è riportato solo tra il gruppo LO e gli altri tre, e l'eventuale significatività è riportata sulla destra delle medie (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$).

Parametro	DIM	LO	IN-LO	IN-UP	UP	PES¹
Glucosio (mmol/l)	7	3,28	3,70 *	3,75	3,34	0,17
	14	3,62	3,81	3,69	3,72	
	34	3,47	3,78	3,79	3,65	
NEFA (mmol/l)	7	1,19	0,81	0,88	0,58	0,13
	14	0,88	0,67	0,67	0,49	
	34	0,17	0,39	0,18	0,12	
β OHB (mmol/l)	7	1,24	0,54	0,52	0,47	0,13
	14	0,73	0,45	0,50	0,48	
	34	1,07	0,69	0,66	0,71	
Urea (mmol/l)	7	3,08	2,68	3,50	4,24	0,43
	14	3,06	2,67	3,35	4,11	
	34	3,97	3,74	4,62	4,98	
Creatinina (μ mol/l)	7	96,16	96,16	103,88	109,58	3,75
	14	90,62	91,13	98,08	103,73 *	
	34	85,11	83,42	84,38	93,15	

¹ PSE= pooled standard error.

In tutti i gruppi (ad eccezione di IN-UP) la glicemia è aumentata nel corso dei primi 14 giorni di lattazione, mostrando successivamente livelli o in calo o in aumento. Quest'ultima variazione è in parte giustificata dall'effetto del pasto, in quanto al 34° giorno di lattazione il prelievo è stato eseguito tre ore dopo la distribuzione dell'unifeed. Al 7° giorno di lattazione il gruppo LO ha mostrato un livello di glucosio più basso rispetto al gruppo INLO ($P < 0,05$) e IN-UP, mentre è risultato analogo ad UP.

Al 7° giorno dal parto, gli animali appartenenti al gruppo LO hanno mostrato più elevati valori di NEFA e di β OHB rispetto agli altri gruppi, dimostrando una più elevata lipomobilizzazione ma non sono state osservate differenze statisticamente significative.

In tutti e quattro i gruppi di animali, l'urea è risultata stabile al 7° e al 14° giorno di lattazione ed è poi aumentata al 34° giorno di lattazione, presumibilmente anche per l'effetto del pasto, infatti in tale circostanza il prelievo ematico è stato eseguito 3 ore dopo la distribuzione dell'unifeed. Nel complesso, l'urea è risultata più bassa nei gruppi LO e IN-LO rispetto ad IN-UP e UP fin dal primo controllo ematico, ma non sono state evidenziate differenze statisticamente significative per la elevata variabilità del parametro.

La creatinina è un indice della entità della massa muscolare, essa è tanto più elevata quanto maggiore è la concentrazione ematica di creatinina, a parità di altre condizioni (in particolare della funzionalità renale). Nei quattro gruppi di animali il suo andamento è caratterizzato da una progressiva diminuzione. I gruppi LO e INLO hanno mostrato livelli al 7° DIM più bassi rispetto a quelli di INUP e UP (ns). Al 14° giorno di lattazione, il gruppo LO ha mostrato un valore di creatinina significativamente più basso rispetto a quello del gruppo UP (90,62 vs 103,73 $\mu\text{mol/l}$, $P < 0,05$) dovuto presumibilmente ad una maggiore riduzione della massa muscolare (anche se i valori nel gruppo LO erano decisamente più bassi sin dall'inizio).

Indici dell'integrità cellulare

Nella Tabella 4 sono riportate le medie relative all'andamento delle concentrazioni plasmatiche degli indici dell'attività epatica dei controlli effettuati nel primo mese di lattazione nelle bovine suddivise in quartili di LAI).

Tabella 4. Andamento medio (e errore standard) delle concentrazioni plasmatiche di GOT, GGT, Fosfatasi Alcalina e della PON valutato a 7, 14 e 34 DIM in bovine suddivise in quartili in base al loro LAI (Liver Activity Index) calcolato nel primo mese di lattazione: LO (quartile inferiore) e UP (quartile superiore). Il confronto statistico è riportato solo tra il gruppo LO-LAI e gli altri tre, e l'eventuale significatività è riportata sulla destra delle medie (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$).

Parametro	DIM	LO	IN-LO	IN-UP	UP	PES¹
AST/GOT (U/l)	7	114,86	99,47	105,38	123,21	13,25
	14	137,33	106,07	101,02	101,07	
	34	82,93	79,87	99,96	88,05	
GGT (U/l)	7	19,27	20,82	22,86	25,12	4,00
	14	27,99	25,25	20,60	25,41	
	34	34,62	31,27	25,43	31,51	
ALP (U/l)	7	34,21	62,67	45,29	42,16	11,08
	14	42,18	52,91	41,94	35,11	
	34	38,69	42,72	40,29	33,68	

¹ PSE= pooled standard error

L'andamento dell'aspartato-amino-transferasi (AST/GOT), enzima utile per valutare la presenza di danni alle cellule epatiche in particolare di tipo citolitico, è stato caratterizzato da un aumento nei primi 14 giorni di lattazione seguito da una successiva riduzione in tutti e quattro i gruppi di animali. Anche se non sono state evidenziate differenze significative tra i gruppi di animali, va osservato che nel gruppo LO i valori sono risultati più elevati al 14° DIM.

Anche la γ -glutamyl-transferasi (GGT), è enzima utile a valutare la presenza di danni epatici; ha evidenziato un andamento caratterizzato da un aumento dei valori durante tutto il periodo della lattazione considerato. Anche in questo caso non vi sono differenze significative tra i quattro gruppi di animali, ma il gruppo LO ha mostrato dal 14°DIM i valori più elevati.

La fosfatasi alcalina (ALP) rappresenta sia un indice del danno epatico che del metabolismo degli osteociti. Non sono state riscontrate differenze significative tra i quattro gruppi; tuttavia il gruppo LO ha presentato un lieve aumento nel corso dei primi 14 giorni di lattazione, seguito poi da una diminuzione, mentre gli altri tre gruppi, hanno mostrato una progressiva diminuzione durante il periodo studiato. Da segnalare anche che i livelli più elevati sono stati quelli osservati nel gruppo IN-LO.

Parametri ematici della risposta infiammatoria

Nella Tabella 5 è riportata la media relativa agli andamenti delle concentrazioni plasmatiche dei principali indici dell'attività epatica relativi alla risposta infiammatoria dei controlli nel primo mese di lattazione nelle bovine suddivise in quartili di LAI.

Tabella 5. Andamento medio (e errore standard) delle concentrazioni plasmatiche di Aptoglobina, Ceruloplasmina, Globuline, Acido Sialico, Bilirubina e PON valutato a 7, 14 e 34 DIM in bovine suddivise in quartili in base al loro LAI (Liver Activity Index) calcolato nel primo mese di lattazione: LO (quartile inferiore) e UP (quartile superiore). Il confronto statistico è riportato solo tra il gruppo LO e gli altri tre, e l'eventuale significatività è riportata sulla destra delle medie (* = P<0,05; ** = P<0,01).

Parametro	DIM	LO	IN-LO	IN-UP	UP	PES¹
Aptoglobina (g/l)	7	0,94	0,82	0,44	0,56	0,13
	14	0,48	0,42	0,24	0,37	
	34	0,20	0,31	0,13	0,28	
CuCp (µmol/l)	7	3,96	3,64	4,48	3,65	0,32
	14	3,98	3,76	4,25	3,34	
	34	3,74	3,70	3,66	3,32	
Globuline (g/l)	7	39,47	37,41	37,00	38,12	1,80
	14	42,53	39,85	38,64	38,61	
	34	43,00	43,54	42,12	40,80	
Acido sialico (mg/ml)	7	0,62	0,51 *	0,56	0,49 *	0,035
	14	0,60	0,53	0,54	0,50 *	
	34	0,51	0,56	0,54	0,53	
Bilirubina (µmol/l)	7	15,67	7,65 *	6,62 **	8,05 **	1,27
	14	7,86	4,90	4,54	4,99	
	34	1,60	3,01	1,36	1,68	
PON (U/ml)	7	51,09	64,41	75,60 **	74,33 **	6,17
	14	61,29	74,36	90,78 **	92,29 **	
	34	86,78	83,67	100,11	83,53	

¹PSE=pooled standard error

In tutti e quattro i gruppi di animali è stata evidenziata una riduzione del livello di ematocrito (PCV), dal 7° al 34° giorno di lattazione; i valori medi osservati nei quattro quartili sono stati: 0,30, 0,29, 0,29 e 0,28 ±0,008 rispettivamente per il gruppo LO, IN-LO, IN-UP e UP. Per questo parametro non sono state evidenziate differenze significative tra i gruppi di LAI.

Proteine positive della fase acuta (+APP)

L'aptoglobina ha mostrato una progressiva diminuzione nel corso del primo mese di lattazione. Al 7° giorno di lattazione, gli animali appartenenti al gruppo LO hanno mostrato un più elevato valore

di aptoglobina rispetto agli animali degli altri 3 gruppi (0,94 vs 0,61 g/l), suggerendo che queste bovine sono state caratterizzate da una maggiore frequenza e/o gravità di fenomeni infiammatori subito dopo il parto.

La ceruloplasmina (CuCp) ha mostrato un aumento nei primi 14 giorni di lattazione nei gruppi di animali LO e IN-LO, e una riduzione nei gruppi IN-UP e UP. Successivamente, dal 14° al 34° giorno di lattazione, si è registrato un calo di tale parametro in tutti e quattro i gruppi di animali. I valori medi di CuCp sono risultati inferiori nel gruppo di animali UP-LAI rispetto agli altri tre (ns). Relativamente all'acido sialico, il gruppo LO ha mostrato a 7 giorni valori significativamente più elevati rispetto ai gruppi INLO e UP ($P<0,05$) e a 14 giorni di lattazione rispetto al gruppo UP ($P<0,05$).

Non sono state invece evidenziate differenze significative tra i quattro gruppi di animali relativamente alla concentrazione di globuline plasmatiche, tuttavia il loro andamento è stato caratterizzato da un progressivo aumento nel corso del periodo considerato.

Proteine negative della fase acuta (-APP)

Oltre ai parametri già descritti dell'indice LAI, sono considerate fra le proteine negative di fase acuta la bilirubina e la PON.

Gli andamenti relativi a colesterolo, albumine e vitamina A (Tabella 2) sono stati precedentemente commentati tra i parametri che compongono l'indice della funzionalità epatica LAI e quindi non verranno qui esaminati.

I valori di bilirubina totale, presentati qui tra le proteine di fase acuta negative poiché un suo innalzamento indica una inadeguata sintesi di proteine (dunque un calo) preposte alla sua escrezione, hanno mostrato un andamento pressoché identico nei quattro gruppi di animali considerati, caratterizzato da valori molto elevati al 7° DIM, benché negli animali appartenenti al gruppo LO il valore iniziale sia pressoché doppio (15,67 $\mu\text{mol/l}$), e da una diminuzione nel corso del primo mese di lattazione. Differenze statisticamente significative sono state osservate in tale giorno di lattazione tra il gruppo LO vs IN-LO ($P<0,05$) e vs IN-UP e UP ($P<0,001$).

La paraoxanasi (PON) ha mostrato in tutti e quattro i gruppi di animali un andamento caratterizzato da un progressivo aumento soprattutto nei gruppi LO e IN-LO che avevano avuto il calo più accentuato nell'intorno del parto. Differenze significative sono state riscontrate al 7° e al 14° giorno di lattazione tra il gruppo LO e i gruppi IN-UP e UP.

Indici di Stress ossidativo

Nella Tabella 6 sono riportate le medie relative all'andamento delle concentrazioni plasmatiche degli indici di Stress ossidativo dei controlli effettuati al primo mese dalle bovine suddivise in quartili di LAI.

Tabella 6. Andamento medio (e errore standard) delle concentrazioni plasmatiche dei Metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROMt), della Vitamina E e dei Gruppi Tiolici (SHp) valutato a 7, 14 e 34 DIM in bovine suddivise in quartili in base al loro LAI (Liver Activity Index) calcolato nel primo mese di lattazione: LO (quartile inferiore) e UP (quartile superiore). Il confronto statistico è riportato solo tra il gruppo LO e gli altri tre, e l'eventuale significatività è riportata sulla destra delle medie (* = P<0,05; ** = P<0,01).

Parametro	DIM	LO	IN-LO	IN-UP	UP	PES¹
ROMt (mgH ₂ O ₂ / 100ml)	7	14,34	11,02 **	14,03	10,18 **	0,86
	14	12,48	11,33	12,98	11,06	
	34	13,07	13,13	13,18	11,56	
Tocoferolo (µg/ml)	7	0,72	0,94	1,50 *	1,14	0,23
	14	0,60	0,99	1,92 **	1,14	
	34	1,64	2,47 *	2,69 **	2,57 **	
SHp (µmol/l)	7	211,06	203,35	246,69	220,48	22,52
	14	212,31	231,08	231,00	234,53 **	
	34	375,41	357,46	315,08	392,67	

¹PSE=pooled standard error

I metaboliti reattivi dell'ossigeno totali (ROMt) hanno presentato un andamento analogo negli animali appartenenti al gruppo LO e IN-UP, caratterizzato da un calo nei primi 14 giorni di lattazione e da un successivo aumento. Negli altri due gruppi, invece si sono osservati valori più bassi al 7° giorno e poi è seguito un lento ma progressivo aumento più marcato però nel gruppo IN-LO.

Nel corso del periodo considerato, il tocoferolo (o vitamina E) ha mostrato un progressivo aumento della sua concentrazione. Tuttavia si riscontrano differenze significative sia a 7 che a 14 giorni di lattazione tra il gruppo LO che ha mostrato i livelli più bassi rispetto al gruppo IN-UP (P<0,001). Al 34° giorno di lattazione invece, sono state osservate differenze statisticamente significative tra LO e tutti e tre gli altri gruppi di animali (LO vs IN-LO, P<0,05; LO vs IN-UP e UP, P<0,001).

Relativamente alla concentrazione dei gruppi tiolici (SHp) nel plasma che si riducono in caso di ossidazione delle proteine si osserva un progressivo aumento in tutti i gruppi. Al 14° giorno di lattazione, le bovine appartenenti al gruppo LO hanno mostrato un valore significativamente più basso rispetto al gruppo UP (212,31 vs 234,53 µmol/l, P< 0,001). Le differenze tra questi due gruppi permangono anche a 34 DIM, ma non raggiungono più la significatività statistica.

Parametri del Metabolismo minerale

Nella Tabella 7 sono riportate le medie relative all'andamento delle concentrazioni plasmatiche dei parametri del metabolismo minerale dei controlli effettuati nel primo mese di lattazione delle bovine suddivise nei quattro gruppi di LAI.

Tabella 7. Andamento medio (e errore standard) delle concentrazioni plasmatiche di Calcio, Fosforo, Zinco, Magnesio, Sodio, Potassio, Cloro valutato a 7, 14 e 34 DIM in bovine suddivise in quartili in base al loro LAI (Liver Activity Index) calcolato nel primo mese di lattazione: LO (quartile inferiore) e UP (quartile superiore). Il confronto statistico è riportato solo tra il gruppo LO e gli altri tre, e l'eventuale significatività è riportata sulla destra delle medie (* = P<0,05; **= P<0,01).

Parametro	DIM	LO	IN-LO	IN-UP	UP	PES¹
Calcio (mmol/l)	7	2,39	2,54	2,52	2,54	0,057
	14	2,55	2,54	2,57	2,58	
	34	2,41	2,52	2,66 *	2,38	
Fosforo (mmol/l)	7	1,51	1,45	1,32	1,32	0,130
	14	1,50	1,76	1,51	1,41	
	34	1,94	1,62	1,85	1,59	
Zinco (µmol/l)	7	9,71	11,58	10,73	11,53	1,183
	14	12,47	12,05	11,29	10,94	
	34	12,46	10,97	11,74	10,72	
Magnesio (mmol/l)	7	0,90	0,95	0,96	0,98	0,172
	14	0,99	1,00	1,00	1,04	
	34	0,99	0,98	1,03	1,01	
Sodio (mmol/l)	7	144,58	146,72	144,15	144,71	0,866
	14	143,90	145,12	144,61	145,11	
	34	139,96	141,54	142,58 *	142,21	
Potassio (mmol/l)	7	3,96	4,36	4,35	4,10	0,146
	14	3,99	4,58 *	3,77	4,16	
	34	3,68	3,94	3,78	3,77	
Cloro (mmol/l)	7	104,02	106,95 *	105,07	103,34	1,041
	14	104,22	105,85	105,40	104,65	
	34	101,06	101,99	103,17	101,01	

¹PSE=pooled standard error

Il calcio, il cui livello ematico può indicare, soprattutto dopo il parto, la classica ipocalcemia puerperale od il collasso puerperale, ha mostrato i valori più bassi nel gruppo LO al 7° giorno di lattazione. Dal 14° giorno di lattazione i livelli tra i 4 gruppi sono risultati analoghi. Al 34° giorno di lattazione, i valori sono risultati in calo in tutti i gruppi eccetto che in quello IN-UP. La differenza è risultata statisticamente significativa rispetto al gruppo IN-UP (P <0,05).

Relativamente alla concentrazione plasmatica di fosforo, non sono state evidenziate differenze significative tra i quattro gruppi di animali. L'andamento di questo parametro in tutti e quattro gruppi è stato caratterizzato da un aumento con il procedere della lattazione.

Non si sono riscontrate differenze significative tra i quattro gruppi di animali relativamente alla concentrazione di zinco. Tuttavia, il gruppo LO ha mostrato i valori più bassi al 7° giorno.

Anche il magnesio nei quattro gruppi LAI ha mostrato valori più bassi al 7° giorno di lattazione, a cui ha fatto seguito un progressivo aumento. Il gruppo LO ha mostrato il valore più basso rispetto agli altri al 7° giorno di lattazione, ma la differenza non è stata statisticamente significativa.

Il sodio ha mostrato livelli più elevati al 7° giorno di lattazione e poi è diminuito in tutti i gruppi. Al 34° giorno di lattazione si sono osservati i valori più bassi, probabilmente anche per effetto del pasto. In corrispondenza di questo controllo è stata riscontrata una differenza significativa tra il gruppo LO, che ha mostrato il più basso livello, ed il gruppo IN-UP (139,96 vs 142,58 mmol/l, $P < 0,05$).

Riguardo alla concentrazione plasmatica di potassio, il gruppo LO ha mostrato i valori più bassi durante tutto il periodo considerato. Al 14° giorno di lattazione è stata evidenziata una differenza significativa tra il gruppo LO e il gruppo IN-LO (3,99 vs 4,58 mmol/l, $P < 0,05$). Come per il sodio, anche il potassio ha mostrato livelli più bassi la 34° giorno di lattazione per tutti i gruppi.

Il cloro ha mostrato valori più elevati nei primi 14 giorni di lattazione e valori molto più bassi al 34° giorno di lattazione in tutti i gruppi, al 7° giorno di lattazione una differenza significativa è stata riscontrata tra i gruppi LO, IN-UP e UP che hanno mostrato i valori più bassi e il gruppo IN-LO ($P < 0,05$).

Cortisolo

Dall'analisi dei dati relativi al livello di cortisolo basale riscontrato al 34° giorno di lattazione (Tabella 8), non sono state riscontrate differenze significative tra i quattro gruppi di animali, anche se tali valori ($6,99 \text{ ng/mL} \pm 2,85$) sono risultati leggermente più elevati rispetto a quelli usuali ($< 5 \text{ ng/mL}$). I gruppi LO e UP sono quelli con i valori basali più prossimi a quelli ritenuti usuali per bovine non ritenute in condizione di stress acuto e cronico.

Tabella 8. Andamento dei livelli di cortisolo nel plasma e AUC (area sotto la curva) in bovine sottoposte a *challenge* con ACTH e suddivise in quartili in base al loro LAI (Liver Activity Index) calcolato nel primo mese di lattazione: LO (quartile inferiore) e UP (quartile superiore). Prelievi eseguiti al 34° giorno di lattazione a 0, 30 e 60 minuti dall'inizio del *challenge*.

LAI	Sigla stalla	Cortisolo (ng/mL)			
		Minuti dal challenge 0	Minuti dal challenge 30	Minuti dal challenge 60	AUC
LO	30	1,85	23,19	12,06	904
	72	6,17	21,42	15,32	965
	135	2,60	43,85	33,39	1855
	199	5,33	32,49	29,95	1504
	201	3,94	43,14	26,88	1757
	255	9,27	38,92	37,93	1876
Media		4,86	33,83	25,92	1477
DS		2,70	9,82	10,22	441
ES		1,11	4,02	4,19	180,61
IN-LO	83	8,49	40,90	32,25	1838
	136	5,70	36,72	27,90	1606
	151	13,47	50,13	34,93	2230
	173	8,70	51,31	39,86	2268
	182	9,99	31,90	21,18	1425
	185	5,62	48,40	28,09	1958
Media		8,66	43,23	30,70	1887
DS		2,93	7,95	6,47	336
ES		1,20	3,26	2,65	137,52
IN-UP	12	6,80	44,53	23,97	1797
	19	5,62	52,43	45,48	2339
	95	9,43	41,62	33,72	1896
	247	12,38	41,77	37,71	2004
	249	10,47	43,14	23,50	1804
Media		8,94	44,70	32,87	1968
DS		2,74	4,48	9,36	224
ES		1,23	2,01	4,20	100,41
UP	16	4,10	37,63	35,63	1725
	84	2,84	40,90	23,39	1620
	131	3,68	36,13	26,96	1544
	184	9,59	47,04	34,35	2070
	227	9,20	58,50	35,74	2429
	273	3,72	53,21	34,96	2177
Media		5,52	45,57	31,84	1927
DS		3,03	8,96	5,31	351,23
ES		1,24	3,67	2,18	143,95

Challenge con Synacthen

IL *challenge* con Synacthen (ACTH) è stato effettuato al 34° giorno di lattazione, a partire da tre ore dopo la distribuzione dell'unifeed (tempo 0). I prelievi ematici sono stati effettuati oltre che al tempo 0, anche dopo 30 e 60 minuti dall'iniezione di Synacthen. In Tabella 9 sono riportati gli altri parametri ematici controllati durante tale *challenge*: ematocrito (PCV), glucosio, urea, NEFA e β OHB.

Tabella 9. Andamento medio (e errore standard) delle concentrazioni di ematocrito (PCV) e di quelle plasmatiche relative a Glucosio, NEFA, β OHB, Urea e Cortisolo valutato a 34 DIM (al tempo 0, a 30 e 60 minuti dopo il challenge con ACTH) in bovine suddivise in quartili in base al loro LAI (Liver Activity Index) calcolato nel primo mese di lattazione: LO (quartile inferiore) e UP (quartile superiore). Il confronto statistico è riportato solo tra il gruppo LO-LAI e gli altri tre, e l'eventuale significatività è riportata sulla destra delle medie (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$).

Parametro	DIM	Min	LO	IN-LO	IN-UP	UP	PES ¹
PCV (l/l)	34	0	0,28	0,28	0,28	0,27	0,008
	34	30	0,28	0,27	0,28	0,26	
	34	60	0,28	0,28	0,28	0,26 *	
Glucosio (mmol/l)	34	0	3,47	3,78	3,79	3,65	0,13
	34	30	3,34	3,68	3,78 *	3,69	
	34	60	3,36	3,83 *	3,82 *	3,83	
NEFA (mmol/l)	34	0	0,17	0,39	0,18	0,12	0,07
	34	30	0,14	0,28	0,14	0,10	
	34	60	0,17	0,19	0,14	0,10	
β OHB (mmol/l)	34	0	1,07	0,69	0,66	0,71	0,15
	34	30	1,13	0,76	0,68	0,68	
	34	60	1,08	0,74	0,70	0,64	
Urea (mmol/l)	34	0	3,97	3,74	4,62	4,98	0,46
	34	30	3,82	3,74	4,46	4,82	
	34	60	3,73	3,78	4,46	4,60	

¹PSE=pooled standard error

Nella già citata tabella non è stato invece registrato l'andamento del cortisolo riportato in Tabella 8. In tutti i soggetti il cortisolo è aumentato dopo il trattamento mostrando il picco 30 minuti dopo. Nel gruppo di animali LO, la risposta delle ghiandole surrenali conseguente al challenge di ACTH è risultata significativamente più bassa a 30 minuti rispetto a quella ottenuta negli altri tre quartili (33,8 vs 44,5 ng/ml). Anche il calo successivo è stato più ampio nel gruppo LO. Tale risultato è confermato dalla differenza significativa tra i valori delle aree (AUC) (Tabella 8) (rispettivamente pari a 1477 ng/ml nel gruppo LO vs 1927 ng/ml in quello UP, $P < 0,01$).

In conseguenza del trattamento con Synacthen, il livello di ematocrito è rimasto pressoché costante dopo il trattamento nei quattro gruppi di animali. Il gruppo LO ha mostrato un valore significativamente più alto dopo un'ora dal trattamento rispetto al gruppo UP (0,28 vs 0,26 l/l), tale differenza è risultata significativa ($P < 0,05$), per effetto del lieve calo verificatosi in UP.

La glicemia, ha mostrato nei due gruppi di animali a basso LAI (LO e IN-LO) una riduzione dopo trenta minuti dal trattamento. Il gruppo IN-UP e UP, invece sono stati caratterizzati da una stabilità dei livelli. A trenta minuti dal trattamento, il gruppo LO ha mostrato un valore di glucosio significativamente più basso rispetto a quello del gruppo IN-UP (3,34 vs 3,69 mmol/l, $P < 0,05$); mentre a sessanta minuti dal trattamento sempre il gruppo LO ha mostrato valori significativamente più bassi rispetto ai gruppi IN-LO e IN-UP (3,36 vs 3,83 e 3,83 mmol/l, $P < 0,05$).

L'urea ha subito una lieve diminuzione dopo il trattamento nei gruppi LO, IN-UP e UP. Solo nel gruppo IN-LO è rimasta sostanzialmente stabile.

Nei primi trenta minuti dopo il trattamento, il livello di NEFA ha subito un calo in tutti e quattro i gruppi; successivamente, solo nel gruppo LO si è avuto un lieve aumento. Non sono state evidenziate differenze significative tra i quattro gruppi di animali.

Anche per il β OHB non si sono avute delle variazioni significative nel tempo e non si sono evidenziate differenze tra i gruppi. Tuttavia, per tre gruppi su quattro (LO, IN-LO e IN-UP) si è potuto osservare un lieve aumento trenta minuti dopo il trattamento, mentre nel gruppo UP si è verificata una lieve riduzione.

8.5 DISCUSSIONE

All'interno della prova non è stato possibile distinguere gli animali in funzione dello SDIB, rivolto alla valutazione di allevamento e comunque, che è comunque risultato essere buono nel complesso (81,6%). Tuttavia, alcuni parametri "individuali" hanno denotato una qualche decisa differenza fra i soggetti del gruppo LO rispetto agli altri (UP in particolare); in LO si nota infatti un più elevato grado di sporczia, una maggiore presenza di capezzoli con punta anomala, una maggiore presenza di problemi sanitari nel puerperio e nonostante un pelo lucido più frequente, la produzione di latte significativamente inferiore (33,8 vs 37,9 kg/d) conferma che per molti versi le bovine di questo gruppo godevano di minor benessere (fra gli altri gruppi le differenze sono meno evidenti).

Pur senza un criterio specifico di valutazione, si può dunque ritenere che un certo grado di "stress cronico" (o di malessere) fosse presente fra le bovine del gruppo LO. Appare quindi importante verificare se ciò sia in relazione con quei parametri, prevalentemente fisiologici, utilizzati per validare lo stato di benessere stimato in altro modo.

Una varietà di parametri fisiologici è stata proposta al fine di individuare i possibili "candidati" per evidenziare la condizione di stress cronico. Tra questi la concentrazione plasmatica di cortisolo è un indice usato per valutare la condizione di stress nei mammiferi; infatti l'aumento della cortisolemia è un comune effetto dello stress acuto (Sapolsky e coll., 2000) e rappresenta la conseguenza finale dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene.

Dalla nostra ricerca, che ha coinvolto 23 bovine in fase iniziale di lattazione e che sono state suddivise in base all'indice LAI (Liver Activity Index, Bertoni et al., 2008) in 4 quartili (LO, IN-LO, IN-UP e UP), è stato evidenziato che tra i quattro gruppi di animali non sono emerse differenze significative in merito al livello di cortisolo basale, mentre è risultato mediamente più elevato rispetto ai valori riportati in letteratura (Ndibualonji e coll., 1995) specialmente in due animali appartenenti ai due quartili intermedi (rispettivamente 13,47 ng/ml per l'animale del gruppo IN-LO, e 12,38 ng/ml e 10,47 ng/ml per gli animali del gruppo IN-UP). I dati lascerebbero presupporre che in questi tre soggetti si sia verificata una condizione di stress derivante per esempio dall'esecuzione del prelievo arrecando disturbo agli animali che può aver alterato il livello di cortisolo basale. Si confermerebbe che l'utilizzo del cortisolo basale o della risposta al *challenge* con ACTH come indicatore di una condizione di stress negli animali domestici richiede cautela, poiché come è stato evidenziato in precedenza, ci sono alcuni fattori che ne possono influenzare il livello basale, tra questi si possono ricordare: la tipologia e la gravità dello stress (Mendoza et al., 2000; Bertoni et al., 2005a); il ritmo circadiano (Möstl and Palme, 2002); l'esecuzione del prelievo (Negrão et al., 2004).

Per contro, con l'ACTH *challenge*, ottenuto tramite la somministrazione endovenosa pari a 20 µg di un analogo sintetico della corticotropina in tutti gli animali della prova, i valori di cortisolo a 30 minuti, momento in cui è stato raggiunto il picco della concentrazione di cortisolo, denotano una variabilità all'interno dei 4 gruppi di animali (crescente da LO ad UP).

La notevole variabilità osservata tra i gruppi potrebbe essere dovuta alla bassa dose di ACTH somministrata ad ogni singolo animale, alla capacità di legare il cortisolo diversa per ogni singolo animale; ciò eviterebbe infatti il raggiungimento in tutti i soggetti del massimo possibile (asintoto) facilitando la differenziazione in funzione della reattività surrenale. In questo caso, si potrebbe affermare che tale reattività è risultata maggiore nel gruppo di animali UP (caratterizzato da soggetti in condizioni migliori rispetto a quelle degli altri gruppi). Infatti, i risultati relativi alla concentrazione plasmatica di cortisolo a 30 minuti dall' ACTH *challenge*, il gruppo di animali LO ha mostrato la più bassa concentrazione di questo parametro (33, 83 ng/ml vs 44,5 ng/ml valore medio di cortisolo relativo ai gruppi di animali IN-LO, IN-UP e UP); nel nostro caso la giustificazione potrebbe essere diversa rispetto alla minore risposta delle ghiandole surrenali.

Infatti, si va ad analizzare la condizione metabolica-sanitaria degli animali appartenenti al gruppo LO quelli che hanno mostrato una condizione infiammatoria più grave e prolungata durante la prima settimana dopo il parto e di conseguenza i più bassi valori dell'indice LAI, si può evidenziare che i fenomeni infiammatori che si sono avuti nell'immediato post parto probabilmente derivanti dall' insorgenza di infezioni, di dismetabolie, di traumi, di rilascio di endotossine nell'intestino o di una condizione di stress che si sono verificati in precedenza, hanno provocato il rilascio di citochine pro infiammatorie (Grimble, 1990). Il loro principale effetto sul fegato è stato la stimolazione della fase acuta (Fleck, 1989) che è caratterizzata da un aumento della produzione da parte del fegato delle proteine positive di fase acuta, a discapito di quelle negative.

Infatti in questo gruppo di animali è stato evidenziato che l'aptoglobina (principale esempio di proteina positiva di fase acuta), che a 7 giorni dal parto ha mostrato un valore nettamente superiore (0,94 g/l) rispetto a quello ritenuto ottimale (0,2 g/l). Contemporaneamente vi è stato un calo di colesterolo, albumine e vitamina A (parametri che compongono l'indice LAI); inoltre si è avuto un innalzamento della concentrazione plasmatica di bilirubina, derivante da una mancata sintesi epatica degli enzimi preposti alla sua escrezione e un notevole aumento della paraoxonasi giacchè molto bassi erano i valori di questo parametro intorno al parto (tutti parametri inclusi direttamente o indirettamente tra le proteine negative di fase acuta).

Da notare che fra le proteine negative di fase acuta, può essere inclusa la transcortina, proteina che veicola il cortisolo nel sangue (Greenspan, 1986) da parte del fegato. Questo calo della produzione di transcortina potrebbe infatti essere tanto più accentuato quanto maggiore è l'entità del fenomeno

infiammatorio da cui l'animale è colpito (situazione del gruppo LO). Se così fosse, i ridotti valori di cortisolo al momento del picco, anziché indicare una ridotta risposta delle ghiandole surrenali, riscontro contrario a quanto atteso nel gruppo LO caratterizzato da un minore benessere, potrebbe indicare una minore capacità di "veicolare" il cortisolo nel sangue a seguito di un processo negativo per il benessere: l'infiammazione.

Ad ulteriore conferma dell'azione negativa dell'infiammazione sul benessere, è importante sottolineare che, come segnalato da Elsasser e coll. (2000), durante un processo infiammatorio la liberazione delle citochine pro infiammatorie provoca un effetto anoressizzante sull'animale perché agiscono indirettamente sul cervello favoriscono la riduzione dell'apporto alimentare aumentando la produzione di energia stimolando la produzione di leptina (Johnson, 1998). Questo calo di ingestione potrebbe essere confermato dalla più bassa concentrazione plasmatica di urea rilevata negli animali del gruppo LO (3,4 mmol/l vs 4,4 mmol/l del gruppo UP, e da un aumento della concentrazione plasmatica di NEFA e β OHB dimostrando quindi una più elevata lipomobilizzazione (Dirksen e Stóber, 1982).

8.6 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Per concludere, non solo il livello di basale di cortisolo, ma anche il test dell'ACTH *challenge* richiede molte cautele nella esecuzione e soprattutto nella interpretazione dei risultati. In particolare, bassi valori di cortisolo dopo ACTH potrebbero indicare tanto una bassa reattività surrenale, quanto una minore presenza in circolo della transcortina. In termini di valutazione dello stress cronico, ciò sarebbe fonte di confusione in quanto farebbe giudicare non stressati (cronicamente) animali che in realtà lo sono come il gruppo LO.

Dunque, per poter valutare la risposta surrenalica è bene usare bassi dosaggi di ACTH per non saturare la capacità di legare della transcortina, ma al tempo stesso verificare che non siano in atto situazioni all'origine di un forte calo della proteine carrier del cortisolo. Quando quest'ultimo fenomeno si sia verificato, come spesso accade nel puerperio delle lattifere, già il LAI può essere un buon indicatore dello stress cronico, mentre servono ulteriori ricerche per accertare la possibilità di correggere la risposta all'ACTH *challenge* per tener conto della eventuale riduzione della transcortina.

CAPITOLO 9

***“PRIMI TENTATIVI PER SVILUPPARE UN PROTOCOLLO
DI RIFERIMENTO ATTO A VALIDARE I MODELLI DI
VALUTAZIONE DEL BENESSERE NEGLI ALLEVAMENTI
DI BOVINE DA LATTE.”***

9.1 SCOPO

La valutazione oggettiva del benessere negli allevamenti di bovine da latte è molto complessa e controversa. I principali problemi riguardano la scelta degli indicatori da utilizzare nel modello e l'aggregazione dei risultati ottenuti con ciascun indicatore in un punteggio globale che sia espressione del benessere reale. Questi modelli di valutazione del benessere in allevamento richiedono pertanto una validazione, poiché notoriamente non esiste un “*gold standard*” di riferimento rispetto al quale comparare il modello in quanto capace di stimare oggettivamente il benessere. Lo scopo della nostra ricerca è stato quindi il seguente: applicare il modello SDIB di valutazione del benessere in allevamenti di bovine da latte caratterizzati da diversi livelli di benessere e contemporaneamente effettuare rilievi a livello endocrino–metabolico per una valutazione più obiettiva del benessere con cui confrontare i risultati ottenuti con il modello SDIB.

9.2 MATERIALI E METODI

La presente ricerca si è svolta in otto allevamenti di bovine da latte, tipici della pianura Padana situati nelle province di Brescia, Cremona e Parma. Tutti gli allevamenti erano a stabulazione libera con area di riposo a cuccette. In cinque allevamenti il numero di capi in lattazione era compreso fra 250-300 capi, in due era pari a 140-150 capi e in un solo allevamento tale numero era pari a 60 capi. Tutti gli animali, sia i capi in asciutta che quelli in lattazione, erano alimentati con tecnica unifeed e la razione era somministrata agli animali una volta al giorno al mattino. In tutti gli allevamenti, le bovine erano munte due volte al giorno.

La valutazione del benessere animale negli allevamenti si è svolta in diversi momenti durante i quali sono stati raccolti i dati che ne hanno permesso di ottenere la valutazione complessiva di ogni allevamento. La raccolta dei dati e la loro successiva elaborazione è stata effettuata utilizzando il Sistema Diagnostico Integrato Benessere (SDIB) messo appunto dall'Istituto di Zootecnica (Bertoni et al., 1999).

Contemporaneamente ai rilievi previsti nel modello SDIB, sono stati prelevati campioni di sangue da ciascuna bovina in lattazione e successivamente analizzati per ottenere una valutazione più oggettiva del benessere basata su alcuni aspetti fisiologici.

Il modello utilizzato per la valutazione del benessere in allevamento (SDIB) prende in considerazione un elevato numero di indicatori organizzati in tre clusters: allevamento, alimentazione e animale (Calamari e Bertoni, 2009). Tale modello è stato precedentemente descritto nella parte introduttiva.

Ultimata la raccolta di tutte le informazioni necessarie per la compilazione delle schede presenti nel modello SDIB si è proceduto all'elaborazione del punteggio complessivo di benessere delle singole aziende.

Parallelamente ai controlli SDIB è stato eseguito il prelievo dei campioni di alimenti e miscelate per la determinazione dei seguenti parametri: sostanza secca, proteine grezze, lipidi grezzi, ceneri e NDF. Per i concentrati e gli insilati di mais è stata inoltre eseguita l'analisi per la determinazione del contenuto in amido, dell'azoto ammoniacale e del pH. Le metodiche utilizzate per la determinazione dei suddetti parametri sono riportate in Appendice.

In ciascun allevamento, parallelamente ai controlli SDIB, sono stati eseguiti prelievi ematici su una decina di bovine in fase iniziale di lattazione (tra 30-120 DIM). Tali prelievi costituivano la prima operazione eseguita all'arrivo in azienda e venivano effettuati ponendo la massima attenzione a non disturbare gli animali per evitare qualsiasi forma di stress che avrebbe potuto alterare il risultato di alcuni parametri ematici. Sempre con l'intento di non alterare i parametri per effetto dello stress da prelievo o per situazioni di stress antecedenti il prelievo, gli animali non sono stati maneggiati

neppure per la mungitura durante le due ore precedenti al prelievo. La raccolta dei campioni di sangue è stata eseguita prima che venisse distribuita la miscelata. Inoltre si è operato in modo tale che non passassero più di dieci minuti tra la prima e l'ultima bovina sottoposta a prelievo.

Il sangue è stato prelevato dalla vena giugulare utilizzando la tecnica Vacutainer avvalendosi di provette contenenti eparina di litio come anticoagulante (10 IU/ml) (Terumo Europe, Lovanio, Belgio). Subito dopo il prelievo, i campioni di sangue sono stati posti in contenitore refrigerato e trasportati nel laboratorio situato presso l'Istituto di Zootecnica entro un'ora dal prelievo stesso.

All'arrivo in Istituto è stato misurato l'ematocrito utilizzando un microematocritometro su di un'aliquota di sangue intero centrifugata a 12.000 RPM per 11 minuti. La restante frazione di sangue intero è stata centrifugata a 3.500 g per 16 minuti ad una temperatura pari a 6°C ed il plasma è stato separato e suddiviso in quattro aliquote che sono state congelate a -20°C prima di essere analizzate.

Le determinazioni analitiche sono state eseguite mediante l'utilizzo di un analizzatore automatizzato (ILAB 600, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA) a temperatura pari a 37°C.

Sui campioni ematici sono stati determinati i seguenti parametri: glucosio (mmol/l), colesterolo (mmol/l), urea (mmol/l), calcio (mmol/l), fosforo (mmol/l), magnesio (mmol/l), sodio (mmol/l), potassio (mmol/l), cloro (mmol/l), zinco ($\mu\text{mol/l}$), ceruloplasmina ($\mu\text{mol/l}$), proteine totali (g/l), albumine (g/l), globuline (g/l), aspartato-aminotransferasi (AST o GOT) (U/l), γ -glutamilttransferasi (GGT) (U/l), bilirubina ($\mu\text{mol/l}$), fosfatasi alcalina (U/l), aptoglobina (g/l), cortisolo (ng/ml) e fruttosamina ($\mu\text{mol/l}$). Tutte le metodiche per la determinazione di questi parametri sono illustrate in Appendice.

I parametri del profilo metabolico sono stati processati usando i valori di riferimento suggeriti da Bertoni et al. (2000).

9.3 ANALISI STATISTICA

Le otto aziende controllate sono state divise in due gruppi sulla base del punteggio complessivo ottenuto e del punteggio complessivo accettabile 75: le 4 migliori (sono convenzionalmente quelle con un punteggio complessivo di benessere superiore a 75) e le 4 peggiori (sono convenzionalmente quelle con un punteggio complessivo di benessere inferiore a 75). I parametri del sangue sono stati elaborati utilizzando l'Analisi della Varianza ad una via (procedura GLM del SAS, SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC; release 9.1)) considerando come fattore fisso il punteggio di aziende (punteggio complessivo accettabile e non accettabile). I valori individuali di ciascun parametro ematico rilevati in ogni allevamento sono stati confrontati con i limiti stabiliti nel nostro range di riferimento (Bertoni et al., 2000). Si è così evidenziata in ogni allevamento e per ogni parametro la percentuale

di animali con valori al di sotto della soglia minima e al di sopra della soglia massima del range di riferimento. Il modello statistico utilizzato è risultato il seguente:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

in cui:

Y_{ij} = osservazione dell'allevamento i -esimo con punteggio SDIB complessivo j -esimo;

μ = media totale;

G_i = effetto del i -esimo punteggio (i = punteggio complessivo accettabile o non accettabile);

e_{ij} = effetto casuale o errore.

I risultati ematici sono stati inoltre elaborati mediante Analisi delle Componenti Principali (PRINCOMP del SAS, SAS Inst. Inc., Cary, NC; release 9.1) utilizzando come variabili tutti i parametri analizzati. I dati sono stati analizzati utilizzando la trasformazione logaritmica solo per GOT, GGT, aptoglobina e cortisolo. Gli autovalori (quantificano la variabilità spiegata da ogni singola componente in percentuale della variabilità totale spiegata da tutte le componenti utilizzate nel modello) delle 3 componenti principali sono stati correlati con gli indicatori presenti nel modello SDIB.

Le aziende agricole sono state classificate in base ad alcuni parametri del sangue. La prima graduatoria, è basata sulla mediana cortisolo. In base a tale ordinamento, le aziende con i valori più elevati sono state considerate come le aziende con un più basso grado di benessere. Una seconda classificazione è stata ottenuta in base alla percentuale di vacche di fuori del range di riferimento per gli indicatori di sangue della condizione infiammatoria. Come marcatori sono stati considerati: l'aptoglobina e la ceruloplasmina (per questi parametri è stata valutata la percentuale di animali al di sopra del range di riferimento massimo); lo zinco, il calcio, l'albumina e il PCV (per tali parametri invece è stata considerata la percentuale di animali che hanno mostrato un valore al di sotto del minimo). In base a tale ordinamento, le aziende con valori più elevati di tali parametri sono state considerate come le aziende con più basso grado di benessere. Una terza suddivisione è stata ottenuta in base alla percentuale di animali fuori del range di riferimento considerando tutti i parametri del sangue; secondo questo ordinamento, le aziende con i valori più elevati sono state considerate le aziende con il più basso grado di benessere.

La significatività statistica delle differenze tra i due gruppi di aziende è stata dichiarata per un livello di probabilità del 5% ($P < 0,05$) e del 1% ($P < 0,01$).

La programmazione lineare (LP) è stata utilizzata per aggregare i punteggi di ciascun indicatore di un punteggio generale di benessere per ordinare le aziende in base all'ordine stabilito con i parametri del sangue, come indicato in precedenza.

La programmazione lineare è stata a lungo uno standard per la formulazione di razioni a minor costo (Saint-Pierre e Harvey, 1986). In termini matematici il problema proposto nella programmazione lineare (LP) è il seguente:

$$\begin{aligned} & \text{Minimizzare } Z = \sum_j c_j X_j \quad j = 1, \dots, n \\ & \text{Soggetto a: } \sum_j a_{ij} X_j \geq b_i \quad j = 1, \dots, m \\ & X_j \geq 0 \end{aligned}$$

in cui:

c_j = 1/valore ottimale del peso relativo per il j^{th} indicatore nel modello SDIB originale;

b_i = punteggio complessivo di benessere per l'azienda i ;

a_{ij} = punteggio del j^{th} indicatore dell' i^{th} azienda ottenuto con il modello SDIB;

x_j = peso relativo dell' j^{th} indicatore ottenuto con il modello LP.

n = numero di indicatori;

m = numero di aziende.

Al fine di ottenere una soluzione più vicina possibile al modello originale SDIB, molti vincoli sono stati applicati al modello di programmazione lineare. Il vettore "c" è stato creato utilizzando il peso relativo di ciascun indicatore del modello SDIB originale. Questi valori forzano il modello ad utilizzare una quantità maggiore di indicatori scelti tra quelli con un peso relativamente maggiore nel modello SDIB originale. Sono stati inoltre applicati vincoli minimi e massimo a ciascun indicatore. Il minimo di ciascun indicatore è stato fissato a 0,5 volte il peso relativo utilizzato per tale indicatore nel modello SDIB originale, il massimo è stato fissato a due volte il peso relativo utilizzato nel modello SDIB originale. Il vettore "b" è stato ottenuto utilizzando un range intorno al punteggio complessivo benessere di ciascuna azienda ottenuto con il modello SDIB originale, il range è stato modificato per ottenere un punteggio per ogni azienda al fine di ordinare le aziende nello stesso ordine ottenuto con i parametri del sangue. Sono state effettuate due elaborazioni ed il vettore "b" è stato definito modificando i punteggi del modello SDIB originale al fine di ripetere la graduatoria in termini di benessere definita in base alla cortisolemia o in base ai parametri infettivo infiammatori. Per il cortisolo, il vettore "b" è stato ottenuto ordinando le aziende in base alla mediana dei valori di tale parametro; mentre nel secondo caso, tale vettore è stato ottenuto

suddividendo le aziende in base ai valori dei parametri infettivo infiammatori (zinco, calcio cerulo plasmina, albumine, globuline, colesterolo, ematocrito ed aptoglobina).

La matrice "a" contiene i punteggi originali di ogni indicatore ottenuti con l'uso del modello SDIB, in ciascuna azienda. Il vettore "X" contiene la soluzione ottenuta con la programmazione lineare, contenente il nuovo peso relativo di ciascun indicatore.

9.4 RISULTATI

Applicazione del modello di valutazione del benessere animale (SDIB) e relativi punteggi

La presentazione dei risultati ottenuti mediante l'applicazione del modello SDIB per la valutazione del benessere animale verrà effettuata riportando i risultati ottenuti con il modello di valutazione del benessere animale (SDIB) con i relativi punteggi concernenti il benessere complessivo degli allevamenti controllati, nonché i punteggi relativi ai tre cluster analizzati (allevamento, alimentazione e animale), alle varie componenti e ai diversi aspetti inclusi in ogni cluster.

Nella Tabella 1 vengono illustrati i giudizi complessivi individuali (espressi su di una scala con 100 come valore massimo) ottenuti dagli 8 allevamenti oggetto della sperimentazione.

Tabella 1. Giudizio complessivo e punteggi parziali degli 8 allevamenti (AM: allevamenti con punteggio globale > 75 e AP: allevamenti con punteggio globale < 75) oggetto della sperimentazione.

CLUSTER	COMPONENTE DEL CLUSTER	AM (>75)						AP (<75)					
		A	B	C	D	Media	DS	E	F	G	H	Media	DS
Allevamento	Ricoveri e impianti	72,66	77,90	69,99	70,09	72,66	4,54	78,84	73,13	73,68	70,33	74,00	3,55
	Gestione	66,02	74,90	73,22	68,54	70,67**	4,11	64,01	58,78	63,36	53,68	59,96	4,79
	Totale cluster allevamento	70,01	76,70	71,28	69,47	71,87	3,31	72,91	67,39	69,55	63,67	68,38	3,88
Alimentazione	Alimenti	82,47	85,80	85,13	82,74	84,04	1,68	81,06	84,73	72,06	76,96	78,70	5,45
	Razioni	76,82	71,70	65,68	58,04	68,06	8,08	67,62	60,36	72,61	66,58	66,79	5,03
	Totale cluster alimentazione	80,21	80,10	77,35	72,86	77,63	3,44	75,68	74,98	72,28	72,81	73,94	1,65
Animale	Stato salute e riproduzione	82,18	74,20	82,22	79,25	79,46	3,77	75,46	81,32	74,31	71,16	75,56	4,25
	Produzione	82,37	79,90	82,37	78,79	80,86	1,80	79,04	74,77	76,56	76,73	76,78	1,75
	Comportamento	92,02	73,40	87,02	91,20	85,91	8,62	69,98	49,45	55,34	77,84	63,15	13,05
	Totale cluster animale	84,18	75,20	83,21	81,55	81,04	4,04	75,08	73,63	70,97	73,61	73,32	1,71
GIUDIZIO COMPLESSIVO		78,45	77,01	76,44	75,32	76,81	1,30	74,70	72,20	70,90	70,40	72,05	1,92

Le differenze significative tra le medie dei due gruppi sono state indicate con ** = P<0.05 e *** = P< 0.001.

Il punteggio concernente il benessere complessivo osservato negli otto allevamenti oggetto della prova sperimentale è risultato accettabile (superiore alla soglia di 75 stabilita nel modello) in 4 allevamenti convenzionalmente definiti come migliori (allevamenti AM: aziende A, B, C e D in ordine decrescente di punteggio complessivo), mentre negli altri 4 definiti convenzionalmente peggiori (allevamenti AP: aziende E, F, G e H in ordine decrescente di punteggio complessivo) è risultato non accettabile (inferiore alla soglia di 75).

I quattro allevamenti AM hanno mostrato un punteggio medio di ciascun cluster più elevato rispetto a quello delle AP, riportando valori accettabili (superiore alla soglia di 70) per ciascuno di essi.

Cluster Allevamento

Analizzando i punteggi del cluster allevamento, il gruppo AP ha mostrato la media del punteggio di della componente “gestione” significativamente ($P < 0,05$) più bassa rispetto alle aziende AM, solo in un allevamento del gruppo AP (allevamento E) tale punteggio è risultato accettabile (72,9%) rispetto al 70% fissato come minimo per le componenti. In questo gruppo di allevamenti, tale risultato era dovuto soprattutto all’insoddisfacente situazione che riguardava il management dell’allevamento, presente soprattutto in due allevamenti su quattro (H ed F) che hanno mostrato un punteggio più basso rispetto a quello ritenuto accettabile (rispettivamente 53,7% e 58,7 vs 60% fissato come minimo per i singoli aspetti). Nel gruppo AM i valori relativi alla componente “gestione” sono risultati molto vicini al punteggio ottimale, solo l’allevamento B ha mostrato invece un punteggio nettamente superiore (76,28%) rispetto a quello ritenuto accettabile.

Le altre due componenti, strutture e attrezzature, hanno mostrato invece un accettabile punteggio in tutti gli allevamenti controllati, con valori medi leggermente più elevati, ad indicare quindi migliori condizioni, nel gruppo AP.

Cluster Alimentazione

Il cluster alimentazione considera sia gli alimenti che le razioni. Il punteggio medio complessivo relativo al cluster alimentazione è risultato più che adeguato nel gruppo AM (77,6%) e adeguato per le altre (73,9%). Per quanto riguarda gli alimenti si è osservato un punteggio complessivo più che accettabile in entrambi i gruppi di aziende (84,0% nelle aziende migliori rispetto a 78,7% nelle aziende peggiori). Il punteggio di ciascun aspetto della componente relativa agli alimenti è risultato più che accettabile in tutte le otto aziende oggetto della sperimentazione mostrando valori medi più elevati nel gruppo AM rispetto a quello AP (rispettivamente 89,3% e 80,5% per l’aspetto “modalità e conservazione”; e 85,1% e 79,8% per l’aspetto “qualità”; 76,2% e 74,2% per l’aspetto “gestione”).

Per quanto concerne la valutazione visiva degli alimenti utilizzati nelle otto aziende controllate, il silo mais in tutti gli allevamenti visitati (ad eccezione di quello C che non ha utilizzato insilato nella formulazione della dieta per gli animali) si sono ottenuti risultati più che soddisfacenti; in 5 casi su 7 gli insilati hanno ottenuto una qualifica eccellente; negli altri casi invece, gli insilati venivano giudicati come buoni (80-90 punti). Tali risultati sono il frutto di punteggi molto vicini al massimo

nei vari aspetti considerati nella valutazione visiva e di penalizzazione di scarsa entità; solo nell'allevamento E il punteggio ottenuto (75%) è risultato più basso rispetto agli altri.

Dalla valutazione visiva dei fieni di leguminose, si è osservato che nella maggior parte dei casi hanno ottenuto un punteggio più che soddisfacente superando ampiamente la sufficienza. Il gruppo AM ha mostrato un punteggio significativamente più elevato rispetto a quello AP (rispettivamente 84,04% vs 71%, $P < 0,05$); solo in un caso nell'allevamento H appartenente al gruppo AP la valutazione è stata piuttosto scarsa raggiungendo un punteggio pari a circa 68%. Nella maggior parte dei casi, il punteggio di valutazione è risultato elevato; solo in un caso (allevamento D appartenente al gruppo, AM) questo è risultato invece insufficiente (66%).

Entrambi i gruppi di aziende hanno invece mostrato dei punteggi mediamente bassi riguardo alle diete somministrate agli animali nelle diverse fasi fisiologiche. Il punteggio è risultato particolarmente basso nelle aziende C (53,9%) e D (54,9%) del primo gruppo (AM) e nell'allevamento F (60,36%) del secondo gruppo (AP).

Negli otto allevamenti controllati, per quanto riguarda le razioni pre parto, sono stati evidenziati punteggi relativamente bassi in tutti gli allevamenti. Il punteggio minimo nelle razioni per gli animali in asciutta è stato quello delle aziende D ed F (rispettivamente 58% e 60,4%) dove si è evidenziata una eccessiva concentrazione energetica e proteica della razione; valori che sono risultati mediamente elevati sia in AM che in AP (Tabella 2).

Tabella 2. Caratteristiche chimico-nutrizionali stimate in base alla valutazione visiva effettuata nell'ambito del modello SDIB della razione somministrata agli animali durante la fase dell'asciutta e della lattazione nelle 8 aziende controllate (AM: allevamenti con punteggio globale > 75 e AP: allevamenti con punteggio globale < 75).

Parametri	Asciutta				Lattazione			
	AM (>75)		AP (<75)		AM (>75)		AP (<75)	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
UFL Kg/ss	0,72	0,01	0,74	0,09	0,94	0,07	0,95	0,04
PG %ss	10,68	1,66	11,03	2,33	16,10	0,28	15,10	1,17
NDF %ss	54,30	2,16	53,43	1,71	33,63	3,42	33,83	1,32
Amido %ss	8,08	2,09	8,97	6,02	24,51	3,43	26,23	4,28

Nelle razioni per le bovine in lattazione si è osservata una variabilità nel contenuto in proteine gregge e in quello dell'amido (Tabella 2); mentre invece le UFL e l'NDF hanno mostrato un valore simile nei due gruppi di aziende. Per questo parametro, lo SDIB ha attribuito in certi casi punteggi piuttosto bassi ad indicare che tali caratteristiche erano molto diverse da quelle ottimali. I valori più bassi si sono osservati negli allevamenti F, D ed H. In F il punteggio relativo alle bovine in lattazione è risultato basso (42,8%) per l'eccessiva quantità di amido (29,14%ss) non

adeguatamente bilanciata dalla presenza di foraggi e di tamponi, nonché alla mancanza di una differenziazione dell'alimentazione nelle diverse fasi della lattazione.

Per gli allevamenti D ed H tutti i gruppi di bovine in lattazione le diete presentavano consistenti eccessi sia per quanto riguarda l'apporto energetico sia quello proteico; anche nell'allevamento H è stato evidenziato uno scarso punteggio.

I punteggi più elevati per le razioni post parto sono stati osservati negli allevamenti A e C (rispettivamente 80,2% e 77,3%). In queste aziende le razioni caratterizzate da una concentrazione di energia e proteine analoga a quella osservata negli altri allevamenti coprivano più correttamente l'elevata produzione di latte delle mandrie, soprattutto nel caso dell'allevamento A, senza notevoli squilibri.

Cluster Animale

Le maggiori differenze tra i due gruppi di allevamenti, si sono riscontrate al livello del cluster animale (Tabella 3). La media del punteggio complessivo è risultata 81% per il gruppo delle migliori e 73,3% per quello delle peggiori.

Tabella 3. Media e deviazione standard dei punteggi relativi agli aspetti considerati nel cluster animale degli 8 allevamenti (AM: allevamenti con punteggio globale >75 e AP: allevamenti con punteggio globale <75) oggetto della sperimentazione.

CLUSTER	COMPONENTE	ASPETTO	AM (> 75)		AP (< 75)		
			Media	DS	Media	DS	
ANIMALE	Stato Salute e riproduzione	Aspetto esteriore	81,88	2,78	79,49	3,43	
		Funzionalità digerente	81,85	4,73	81,04	5,65	
		Mammella	71,63	9,63	71,62	7,64	
		Arti e piedi	87,14	1,94	82,83	12,48	
		Efficienza riproduttiva	50,44	20,98	44,88	18,94	
		Stato Sanitario	92,59	12,19	84,86	13,86	
	TOTALE STATO SALUTE E RIPRODUZIONE			78,90	3,27	75,56	4,24
	Quantitativa	Produzione di latte	84,30	6,51	68,40	8,73	
		TOTALE	84,30	6,51	68,40	8,73	
	Composizione latte	Contenuto in grasso	77,81	2,16	86,99	5,17	
		Contenuto in proteine	81,02	5,55	79,62	8,72	
		TOTALE	78,61	2,13	85,15	5,40	
	TOTALE PRODUZIONE			81,46	2,64	76,77	1,75
	Interazione animale-uomo	Behaviour Score	82,83	7,33	56,67	13,89	
		TOTALE	82,83	7,33	56,67	13,89	
	Interazione animale-ambiente	Comfort cuccette	72,18	20,08	48,73	25,81	
		Distribuzione animali	97,00	6,00	86,67	8,99	
		Difficoltà ad alzarsi	100,00	0,00	99,32	1,36	
		Grooming	50,00	57,74	50,00	57,74	
		Stereotipie	75,00	10,00	85,00	10,00	
		TOTALE	82,59	17,95	67,04	13,40	
	TOTALE COMPORAMENTO			82,68	10,32	63,15	13,05

Analizzando in maniera approfondita tutte le componenti del cluster animale si è potuto osservare che: relativamente alla componente “produzione” (che comprende produzione e composizione del latte), il gruppo AM hanno mostrato per l’aspetto quantitativo, un punteggio significativamente più elevato rispetto al gruppo AP (84,3% vs 68,4%, $P < 0,05$); tale punteggio è dovuto soprattutto ai più bassi valori di produzione registrati nelle aziende G, F ed H che hanno mostrato un punteggio del 68,2%, 59,8% e 65% rispettivamente.

Osservando infatti i dati relativi alla produzione media annua per capo (t/anno), riportati nella Tabella 4, solo il gruppo AM ha presentato una media produttiva (9,82 ±0,92 t/capo) superiore a quella delle bovine iscritte ed allevate nelle provincie a cui appartengono; nell'altro gruppo invece, tale media è risultata essere inferiore rispetto alla media provinciale.

Per quanto riguarda l'aspetto "composizione del latte" i punteggi significativamente più elevati si sono osservati nel AP (86,99% vs 77,81%, P< 0,05), in conseguenza di un maggiore contenuto di grasso del latte (Tabella 4), al contrario non sono state evidenziate delle differenze tra i due gruppi relativamente al tenore in proteine il cui valore è risultato medio alto in tutte le aziende controllate.

Tabella 4. Principali parametri produttivi degli allevamenti (AM: allevamenti con punteggio globale >75 e AP: allevamenti con punteggio globale <75) visitati.

Gruppo	Allevamento	Produzione annua/capo (t)	Produzione (Kg/d)**	Grasso (%)*	Proteine (%)*	SCC (n/ml)*
AM (>75)	A	10,33	37,74	3,67	3,33	135,87
	B	8,85	32,35	3,73	3,43	273,45
	C	10,83	31,46	3,64	3,44	262,83
	D	9,27	27,28	3,65	3,44	321,42
Media		9,82	32,21	3,67	3,41	248,39
DS		0,92	4,30	0,04	0,05	79,23
AP (<75)	E	9,33	27,90	3,7	3,33	222,75
	F	7,06	21,92	3,88	3,49	331,29
	G	8,07	27,40	3,87	3,31	349,75
	H	7,60	23,96	3,88	3,45	369,58
Media		8,02	25,29	3,83	3,40	318,34
DS		0,97	2,85	0,09	0,09	65,62

** = produzione per capo in mungitura mediamente presente calcolata in base al latte consegnato nei 12 mesi precedenti il controllo;

* = media annuale calcolata in base ai controlli per il pagamento del latte in base alla qualità.

Nell'ambito dell'aspetto "stato e salute e riproduzione", il parametro più strettamente correlato con la produzione è certamente la mammella. Lo SDIB per questo parametro prende in esame la valutazione esteriore (in particolare la condizione della punta dei capezzoli) e la conta delle cellule somatiche nel latte di massa. Il punteggio di questo parametro è risultato accettabile per entrambi i gruppi di aziende; tuttavia il livello di cellule somatiche è risultato leggermente elevato (superiore a 300.000/ml) in diverse aziende (allevamento D, F, G e H); tale risultato fa supporre la presenza all'interno delle mandrie di un certo numero di animali con un elevato numero di cellule (mastite). Solo nell'allevamento A si è registrata una situazione ottimale con un valore medio di cellule somatiche dal latte di massa pari a 135,87 n/ml. Il punteggio SDIB relativo a questo parametro sottolinea infatti questa situazione: in quattro aziende su otto (A, B, C ed E) i punteggi riescono a

raggiungere la sufficienza ($\geq 60\%$). Il punteggio medio del gruppo AM è risultato così più elevato (71,6%) rispetto al gruppo AP (61,7%).

Queste differenze fra i due gruppi di allevamenti sono state compensate dalle differenze osservate dall'esame della punta dei capezzoli. Entrambi i due gruppi di allevamenti (AM e AP), hanno mostrato punteggi relativi a questo aspetto superiori al valore ritenuto accettabile; solo nel caso dell'allevamento B tale punteggio è risultato inferiore sia nella fase iniziale che in quella avanzata di lattazione (rispettivamente 56,39% e 52,65%): tale punteggio è stato dovuto all'elevato numero di capezzoli con qualifica S (sfintere liscio) (41,67%) ed R (sfintere rugoso) (11,11%) nella fase iniziale di lattazione e dalla presenza dell'anello liscio allo sfintere (qualifica S) (50%) in stadio avanzato di lattazione.

Analizzando i dati delle frequenze relative del Teat Score rilevate negli allevamenti visitati sia sulle bovine fresche sia sugli animali in stadio avanzato di lattazione, si può osservare che non sembrano esserci notevoli differenze tra gli "score" relativi agli animali a inizio lattazione e quelli in stadio avanzato. La maggiore frequenza, in entrambi i gruppi, spetta alla qualifica N, o sfintere normale (67-68%), seguita dalla S (15-16%) e da quella NS (7,57% nelle fresche e 11,76% nelle avanti); fortunatamente sono state riscontrate ridotte incidenze dei capezzoli SR ed R; in nessun allevamento si sono diagnosticati anelli allo sfintere tali da comportare l'assegnazione della qualifica VR e soltanto in alcuni allevamenti, ma comunque con una ridotta frequenza, si sono rilevati capezzoli ciechi.

Per queste compensazioni fra contenuto di cellule somatiche e condizioni della punta dei capezzoli il punteggio per la mammella è risultato pressoché identico fra i due gruppi di allevamenti AM e AP.

Per quanto concerne l'aspetto relativo alla riproduzione, appartenente sempre alla componente "stato salute e riproduzione", entrambi i gruppi hanno mostrato un punteggio più basso rispetto al valore accettabile (50.4% per il gruppo AP e 44.8% per quello AM), solo negli allevamenti A ed E l'efficienza riproduttiva è risultata più che accettabile (punteggio di 77% e 70% rispettivamente). Al contrario gli allevamenti con punteggio molto basso sono stati l'allevamento B (26%) e G (24%). Solo gli allevamenti A ed E hanno mostrato un valore di FSI positivo e solo uno di questi (A) ha raggiunto un valore accettabile di FSI (72,02). Negli altri casi l'elevato numero di inseminazioni/gravidanza, il ridotto tasso di concepimento al primo servizio e il lungo intervallo parto-concepimento fanno sì che l'indice risulti spesso negativo, comportando la riduzione del relativo punteggio SDIB.

Andando ad analizzare nello specifico i parametri che compongono tale aspetto, il punteggio è dovuto al numero di inseminazioni per animale gravido che in tutti gli allevamenti è risultato

superiore a ciò che si considera ottimale (≤ 2). Lo stesso si può dire riguardo al tasso di concepimento al primo servizio che è oscillato da un 30% (per gli allevamenti E, G ed H) ad un 50% delle aziende F e C. L'intervallo parto-concepimento è risultato ottimale solo nell'allevamento A, mentre negli altri casi tale intervallo è risultato nettamente superiore al valore ottimale (85 giorni).

Per quanto riguarda l'aspetto "stato sanitario", nel modello SDIB si è considerata l'incidenza di ritenzioni di placenta, di dislocazioni dell'abomaso e di collasso puerperale, nonché la presenza di virus e l'eventuale adozione di piani vaccinali. Tutte gli otto allevamenti oggetto della prova sperimentale hanno avuto dei punteggi tutto sommato piuttosto elevati per questo parametro.

Relativamente all' "aspetto esteriore" tutti gli allevamenti hanno mostrato un punteggio piuttosto elevato (81,8% per il gruppo delle aziende migliori e 79,5% per quello delle peggiori). Verranno di seguito commentati i vari parametri che compongono tale aspetto.

Per il Body Condition Score (BCS) il punteggio è risultato mediamente più elevato (67%) per il gruppo AM rispetto ad AP (62%). Le aziende AP sono state penalizzate soprattutto per un punteggio mediamente basso osservato nelle asciutte (53,3%) rispetto al valore osservato nell'altro gruppo di aziende (73%). Osservando infatti i valori di BCS delle bovine in asciutta nell'allevamento E e G i valori sono risultati tendenzialmente elevati e variabili rispettivamente $3,07 \pm 0,22$. Anche nell'allevamento C del gruppo AP si è osservato un valore di BCS in asciutta tendenzialmente elevato e variabile ($3,09 \pm 0,22$).

Nel punteggio riguardante le bovine ad inizio lattazione le migliori aziende sono risultate la C (77,2%) la F (68,5%) e la G (65,6%). All'inizio della lattazione, gli animali appartenenti alle aziende del gruppo delle peggiori ha mostrato un BCS pari a $2,3 \pm 0,09$ rispetto ad un valore di $2,19 \pm 0,04$ per gli animali della'altro gruppo di aziende; la stessa situazione si è verificata per gli animali in fase avanzata di lattazione, in questo caso i valori sono stati: $2,7 \pm 0,07$ per entrambi i gruppi di aziende.

Analizzando i dati relativi al grado di pulizia degli animali, e quindi indirettamente dell'allevamento si osservano valori di poco superiori nel gruppo AM (86,7%) rispetto a quello AP (83,6%). Si può tuttavia osservare che in tutti e due i gruppi di allevamenti non si sono evidenziati livelli elevati di sporcizia e i punteggi dello SDIB relativi al parametro "Cleanliness Score" si attestano ad un livello relativamente elevato in tutti gli allevamenti.

Relativamente alla valutazione dell'aspetto "arti e piedi" entrambi i gruppi di allevamenti hanno mostrato punteggi piuttosto elevati (rispettivamente 87,14% per il gruppo AM e 82,83% per quello AP). Questa differenza è attribuibile ad una maggiore presenza di zoppie negli allevamenti AP, in

particolare nell'allevamento H. Al contrario i minori problemi di zoppia si sono osservati nell'allevamento B ed E.

La funzionalità del digerente è stata valutata mediante l'esecuzione del "Feces Score". Per quanto riguarda i punteggi sia il gruppo AM che quello AP hanno ottenuto in tutti i casi punteggi più che soddisfacenti e compresi fra 68-94%. Considerando il valore medio di ogni allevamento (mediando i punteggi ottenuti nelle bovine controllate nelle diverse fasi fisiologiche) si osserva che i punteggi più bassi sono stati evidenziati nell'allevamento C (76,8%) e G (75,7%).

Il punteggio sulla ruminazione rientra, con il Feces Score, nell'aspetto riguardante la funzionalità del digerente. Tutte le otto aziende controllate hanno mostrato un punteggio relativamente elevato per questo parametro (rispettivamente 79,12% per il gruppo AM e 77,26% per quello AP).

Il gruppo AP ha mostrato un più basso punteggio medio per la componente Comportamento 63,15% rispetto a quello AM (82,7%). Questo è dovuto soprattutto ad una più problematica interazione animale-uomo con un punteggio significativamente più elevato in AM rispetto ad AP (rispettivamente 82,8% vs 56,7%, $P < 0,05$). Al riguardo i punteggi più bassi sono stati riscontrati nelle aziende E (57%), F (44%), e G (50%). Per quanto concerne l'aspetto relativo all'interazione tra gli animali e l'ambiente circostante tutte le otto aziende visitate hanno evidenziato situazioni più che accettabili con un punteggio superiore nel gruppo AM (82,6%) rispetto ad AP (67,4%). Quest'ultimo è stato penalizzato per il suo punteggio relativo al Comfort della zona di riposo (punteggio di 48,7% contro 72,2% del gruppo AM). Per questo aspetto i valori più bassi si sono osservati nelle aziende F (17,5%) e G (39,2%).

Parametri utilizzati per la validazione

Alimenti e diete

Nella Tabella 5 vengono riportate le caratteristiche chimico nutrizionali degli alimenti utilizzati negli 8 allevamenti e campionati nel corso della prova sperimentale.

Tabella 5. Caratteristiche chimico-nutrizionali chimiche degli alimenti espresse come Media e DS utilizzati negli 8 allevamenti (AM: allevamenti con punteggio globale >75 e AP: allevamenti con punteggio globale <75) controllati.

Allevamento	Alimento		S.S. (%)	P.G. (%s.s.)	NDF (%s.s.)	ADF (%s.s.)	Amido	N-NH ₃ (%N _{tot})	pH	UFL/Kg s.s.
AM (>75)	Insilato di mais	Media	33,39	7,50	41,79		27,90	5,63	3,70	0,87
		DS	2,90	0,55	4,66		2,20	1,93	0,10	0,03
	Fieno di Graminacee	Media	90,06	8,37	60,40	40,90				0,71
		DS	1,27	3,26	2,17	2,30				0,03
	Fieno di leguminose	Media	89,85	17,94	43,28	37,12				0,69
		DS	1,39	1,86	4,10	5,62				0,04
AP (<75)	Insilato di mais	Media	33,28	7,57	36,03		31,93	6,82	3,66	0,90
		DS	0,99	0,41	8,01		5,26	1,61	0,05	0,05
	Fieno di Graminacee	Media	87,64	7,75	64,43	41,17				0,66
		DS	2,16	3,77	3,28	1,60				0,04
	Fieno di leguminose	Media	90,39	18,01	43,21	36,51				0,65
		DS	1,61	0,16	7,07	6,49				0,00

Gli insilati integrali di mais erano ben dotati in amido (rispettivamente in AM e AP 27.90 ± 2.20 e 31.9 ± 5.26). Il tenore in azoto ammoniacale, espresso come percentuale sull'azoto totale, ha mostrato valori superiori al 5%, nei due gruppi di allevamenti (rispettivamente 5.6 ± 1.9 per il gruppo AM e 6.8 ± 1.6 per il gruppo AP come valore medio del gruppo) mantenuta sempre nel range di riferimento; solo gli allevamenti A ($3.46\% N_{tot}$) ed F ($5.01\% N_{tot}$) riescono a sottostare a questo limite; mentre gli allevamenti B ($6.3\% N_{tot}$), D ($7.14\% N_{tot}$), E ($8.82\% N_{tot}$), G ($7.22\% N_{tot}$) e H ($6.25\% N_{tot}$) hanno invece mostrato valori superiori ad esso.

Analizzando i dati relativi ai fieni si osservano valori mediamente nella norma ma con un'ampia variabilità.

I fieni di graminacee sono risultati nel complesso migliori in AM con un valore di RFV (Relative Feed Value) rispettivamente pari a $87,77 \pm 6,52$ per gli allevamenti AM e $82,26 \pm 5,92$ per quelli AP. Molto modeste sono state le differenze nei fieni di leguminose, con valori di RFV pari a $123,37 \pm 18,89$ per gli allevamenti AM e $157,22 \pm 28,11$.

In generale, analizzando le caratteristiche chimico-nutrizionali delle razioni somministrate agli animali prima del parto elaborate mediante l'utilizzo del software di razionamento Razio Best in

uso presso l'Istituto di Zootecnica, nei diversi casi analizzati si nota una maggiore variabilità nei parametri controllati (Tabella 6) soprattutto nelle aziende del gruppo AP.

Tabella 6. Ingestione di sostanza secca e caratteristiche chimico-nutrizionali (esprese come media e deviazione standard) somministrate alle bovine in fase di asciutta e avanzata di lattazione negli 8 allevamenti (AM: allevamenti con punteggio globale >75 e AP: allevamenti con punteggio globale <75) controllati.

Parametri	Asciutta				Lattazione			
	AM (>75)		AP (<75)		AM (>75)		AP (<75)	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Sostanza secca Kg/d	14,91	4,18	12,03	1,72	21,95	0,91	21,90	0,83
UFL U/kg	0,75	0,03	0,73	0,05	0,92	0,04	0,91	0,04
PG % ss	11,12	1,52	11,87	2,56	15,88	0,13	14,90	2,26
Lipidi % ss	2,45	0,37	1,94	0,25	4,46	0,44	4,01	0,57
Amido % ss	9,14	1,36	9,11	5,65	23,16	2,02	26,88	3,59
NDF % ss	54,3	2,15	53,93	2,16	34,60	2,59	34,29	2,03

I valori in asciutta dei parametri chimico-nutrizionali considerati si possono ritenere nella norma in entrambi i gruppi di aziende, con una maggiore variabilità negli allevamenti AP. Anche per le razioni in lattazione si è osservata una maggiore variabilità per questi parametri chimico-nutrizionali negli allevamenti AP; inoltre in questo gruppo di allevamenti si è osservato un valore di amido mediamente elevato.

Le caratteristiche chimico-nutrizionali delle razioni (esprese in percentuale di sostanza secca) utilizzate per le bovine in asciutta e in lattazione stimate con il metodo di valutazione SDIB sono risultate molto simili ai risultati ottenuti con il calcolo effettuato con Razio Best sulla base dei dati analitici.

Nelle Figure 1a e 1b vengono riportati i valori delle razioni stimati con il metodo di riferimento ed il modello SDIB per i parametri UFL (Figura 1a) e NDF (Figura 2b). Nelle Figure 2a e 2b per i parametri amido e proteine grezze. L'errore medio relativo calcolato mediante il rapporto fra l'errore standard della regressione e il valore medio del parametro calcolato con il metodo di riferimento, è risultato per le razioni delle bovine in lattazione: 3.2%, 8.0%, 10% e 4,3% rispettivamente per le UFL; la NDF, l'amido e le proteine grezze. Più imprecise sono risultate le stime delle caratteristiche chimico-nutrizionali mediante il modello SDIB; con un errore medio relativo del 4,8%, 8.7%, 14.7% e 22% rispettivamente per le UFL, la NDF, l'amido e le proteine grezze.

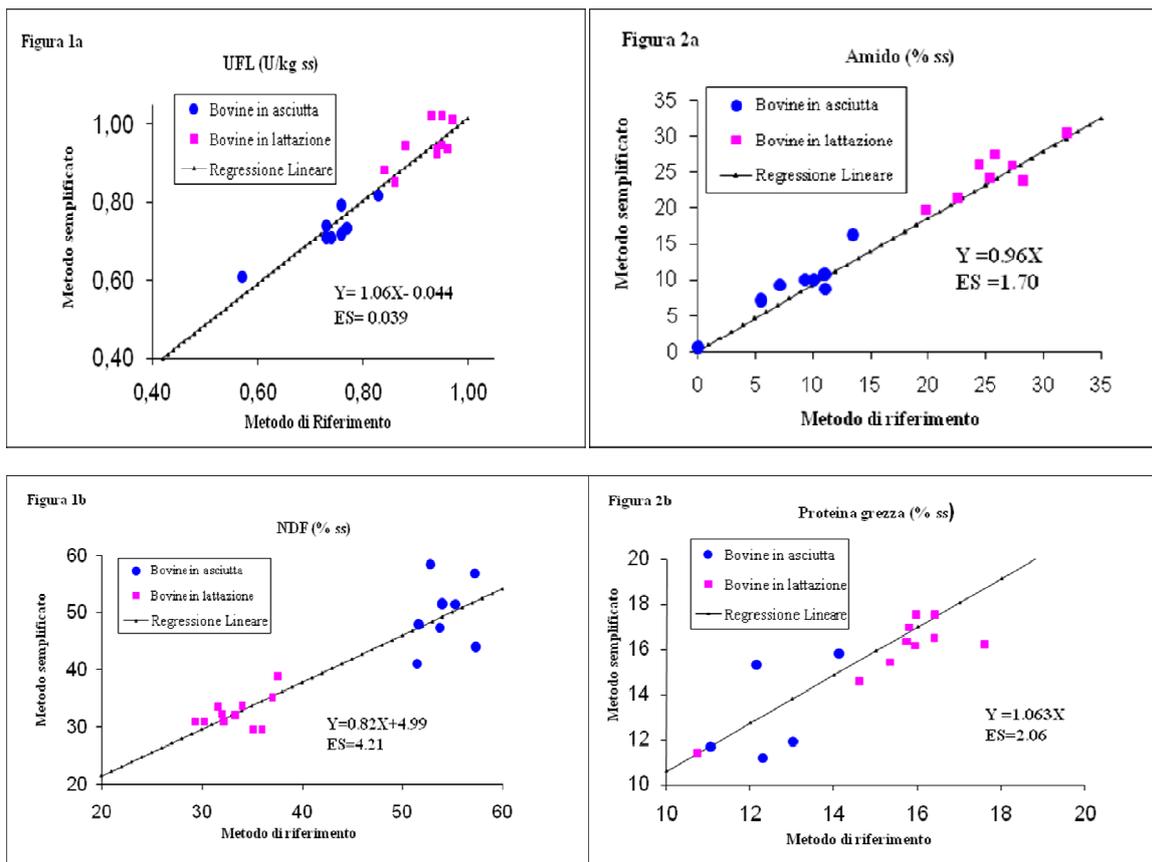


Figura: 1a 1b. UFL e NDF (espressi in percentuale della sostanza secca) delle razioni somministrate agli animali in asciutta e in lattazione calcolati sulla base dei dati analitici (metodo di riferimento) e sulla base della valutazione visiva (metodo semplificato) per la valutazione delle caratteristiche chimiche della razione; 2a 2b. Amido e Proteina grezza (espressi in percentuale della sostanza secca) delle razioni somministrate agli animali in asciutta e in lattazione calcolati sulla base dei dati analitici (metodo di riferimento) e sulla base della valutazione visiva (metodo semplificato) per la valutazione delle caratteristiche chimiche della razione.

Parametri ematici

Nella Tabella 7 vengono riportati i risultati del profilo metabolico ed i valori di cortisolo dei 4 allevamenti migliori e nei 4 peggiori controllati durante la sperimentazione. Nella tabella sono state riportate le medie e la deviazione standard di ogni singolo parametro, la percentuale di animali che ha mostrato valori superiori o inferiori al range di riferimento, nonché i valori di P ottenuti con l'analisi della varianza relativi a: effetto gruppo; effetto allevamento entro gruppo, nonché l'effetto della covariata "distanza parto".

Tabella 7. Comportamento medio delle concentrazioni dei parametri ematici valutati negli 8 allevamenti (AM: allevamenti con punteggio globale >75 e AP: allevamenti con punteggio globale <75) controllati.

Parametri	AM (>75)				AP (<75)				P		
	Media	DS	% Inferiore ¹	% Superiore ²	Media	DS	% Inferiore ¹	% Superiore ²	Gruppo	Allevamento	Covariata Distanza Parto
Ematocrito, l/l	0,297	0,03	6	16	0,308	0,03	3	32	ns	ns	*
Glucosio, mmol/l	4,08	0,30	0	63	4,42	0,29	0	100	***	***	ns
Colesterolo, mmol/l	5,52	0,97	0	59	6,46	1,64	0	72	**	ns	ns
Urea, mmol/l	5,19	0,99	19	24	5,28	0,78	21	31	ns	***	ns
Calcio, mmol/l	2,57	0,16	11	0	2,56	0,12	3	0	ns	ns	ns
Fosforo, mmol/l	1,88	0,29	3	31	1,87	0,27	6	34	ns	***	ns
Magnesio, mmol/l	1,05	0,04	0	10	1,07	0,04	0	15	**	***	ns
Sodio, mmol/l	142,1	1,88	4	53	140,4	2,08	6	38	**	***	ns
Potassio, mmol/l	4,27	0,39	0	0	4,36	0,37	19	0	ns	***	ns
Cloro, mmol/l	104,1	2,06	0	30	102,9	1,65	0	14	**	ns	ns
Zinco, µmol/l	12,8	2,45	25	8	11,9	2,21	24	0	ns	**	ns
Ceruloplasmina, µmol/l	3,27	0,81	4	86	3,43	0,96	0	86	ns	**	ns
Proteine totali, g/l	83,1	6,11	36	36	84,1	4,50	17	47	ns	**	ns
Albumine, g/l	35,9	2,71	34	0	35,7	2,03	29	3	ns	ns	ns
Globuline, g/l	47,3	7,24	16	20	48,4	5,55	9	30	ns	**	ns
Aspartato aminotransferasi (GOT), U/l	98,3	25,29	0	73	90,2	17,37	0	61	ns	**	ns
γ- Glutamilttransferasi (GGT), U/l	31,2	8,24	4	51	28,6	5,05	0	61	ns	**	ns
Bilirubina, µmol/l	1,61	0,66	30	0	1,89	0,99	17	3	*	ns	**
Fosfatasi alcalina, U/l	46,3	17,52	4	34	46,9	13,38	15	17	ns	ns	ns
Aptoglobina, g/l	0,336	0,28	0	32	0,228	0,20	0	20	*	ns	ns
Fruttosamina, µmol/l	236,1	29,17			231,2	21,97			ns	**	ns
Cortisolo, ng/ml	6,99	4,92			10,04	7,68			ns	**	ns

* = P< 0,10; ** = P< 0,05; *** = P<0,001

¹= bovine al di sotto del range di riferimento

²= bovine al di sopra del range di riferimento

La maggior parte dei parametri del profilo metabolico hanno mostrato una elevata variabilità con una elevata percentuale di bovine fuori dal range di riferimento sia nel gruppo delle aziende AM che in quelle AP, alcuni di questi parametri hanno mostrato la tipica variabilità osservata nelle bovine in fase iniziale di lattazione.

L'effetto allevamento è risultato significativo in tutti i parametri ad eccezione di:ematocrito, colesterolo, calcio, cloro, albumine, bilirubina, fosfatasi alcalina, aptoglobina. Al contrario l'effetto della distanza parto è ritenuto significativo solo per ematocrito e bilirubina.

Nei due gruppi di allevamenti controllati non si sono evidenziate differenze significative relativamente ai valori di ematocrito; in tutti i casi tale media rientrava nel range di riferimento. Tuttavia il gruppo AP ha mostrato una percentuale di animali con il valore di ematocrito al di sopra del range di riferimento (32%) rispetto al valore riscontrato invece nel gruppo AM (16%). Per questo parametro la covariata "distanza parto" ha mostrato una differenza significativa tra i due gruppi ($P < 0,10$).

Analizzando i parametri del metabolismo energetico, il valore medio di glucosio, è risultato significativamente più elevato ($4,42 \pm 0,03$ vs. $4,08 \pm 0,03$ mmol/L, $P < 0,001$) nel gruppo AP (aziende che hanno ottenuto il minore punteggio SDIB) e in tutti gli allevamenti controllati il glucosio ha mostrato sempre valori superiori a quello del range di riferimento (Figura 3). La percentuale di animali che non ha mostrato valori di glicemia entro il range di riferimento è risultata elevata in entrambi i gruppi di aziende: nel gruppo delle aziende AP tutti gli animali analizzati hanno mostrato la glicemia superiore a quella di riferimento, mentre in quello degli allevamenti AM essa è pari al 63%.

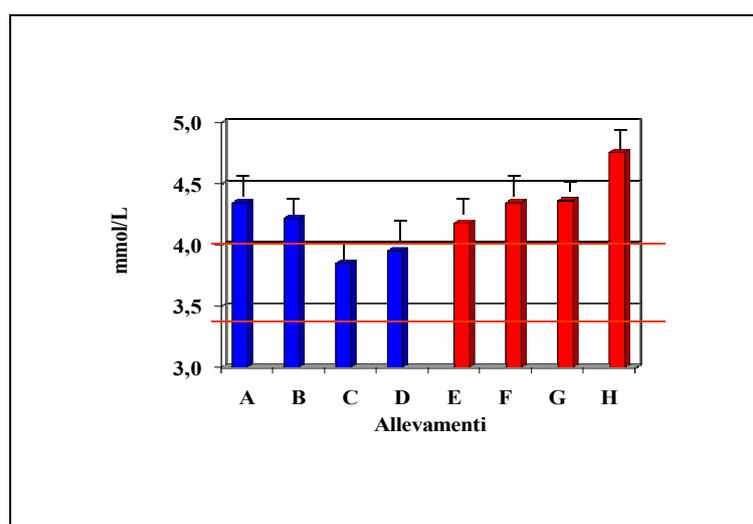


Figura 3. Valori medi di glucosio (\pm ES) nelle 8 aziende controllate ordinate in base al punteggio SDIB Totale, a sinistra del grafico gli allevamenti con un punteggio SDIB > 75 (AM) (A, B, C e D) e a destra quelli con un punteggio SDIB < 75 (AP) (E, F, G e H).

Queste differenze non vengono confermate dai valori di fruttosamina nel plasma. Infatti, il gruppo di aziende migliori ha mostrato al contrario un valore leggermente superiore rispetto a quello del gruppo delle peggiori ($236,13 \pm 29,17 \mu\text{mol/L}$ vs $231,24 \pm 21,97 \mu\text{mol/L}$).

Il colesterolo è risultato sempre al di sopra del range di riferimento e in particolare delle aziende che hanno ottenuto un più basso punteggio SDIB; in queste aziende il valore medio è stato maggiore ($6,46 \pm 0,97$ vs $5,52 \pm 1,64 \text{ mmol/L}$, $P < 0,001$) rispetto a quelle che hanno invece ottenuto un punteggio SDIB più elevato.

Un'elevata variabilità è stata riscontrata tra i parametri del metabolismo proteico senza però mostrare delle differenze tra i due gruppi di aziende. I valori medi di urea ematica sono risultati molto simili nei due gruppi di allevamenti, tuttavia il gruppo delle aziende peggiori ha mostrato una percentuale più elevata (31% vs 24%) di animali superiori al range di riferimento

Anche per le proteine totali non sono state riscontrate delle differenze significative tra i due gruppi di aziende, anche se il gruppo AP ha mostrato una percentuale di animali con valori superiori al range di riferimento più elevata rispetto a quella dell'altro gruppo (47% vs 36%); l'interazione tra l'allevamento e classificazione secondo il punteggio SDIB è risultata significativa ($P < 0,05$).

Non appaiono evidenti differenze nel tasso ematico di albumine negli allevamenti migliori e peggiori, l'unica considerazione che si può fare è sulla percentuale di animali con valori ematici inferiori alla soglia, che risulta essere leggermente maggiore negli allevamenti caratterizzati da un miglior punteggio (34% vs 29%). Anche per le globuline, l'altra frazione delle proteine totali, non sono emerse differenze fra gli allevamenti AP e quelli AM. Solo l'interazione tra l'allevamento e la classificazione secondo il punteggio SDIB è risultata significativa ($P < 0,05$)

Un'elevata variabilità è stata osservata anche per alcuni parametri del metabolismo minerale con valori più elevati di Mg e più bassi di Na e Cl nelle aziende peggiori rispetto a quelli delle migliori. I più bassi valori di Na riscontrati nel gruppo AP sono principalmente dovuti ai più bassi valori di tale parametro dell'allevamento H ($135,8 \pm 3,46 \text{ mmol/l}$); mentre quelli significativamente più elevati del gruppo AM sono probabilmente dovuti ad una percentuale elevata di animali con valori di sodio superiori al range di riferimento presente sia nell'allevamento B, (80%) che in quella D (88%).

Non si è osservata differenza tra i valori medi di potassio registrati nei due gruppi di aziende, nel gruppo di aziende peggiori è stata osservata una percentuale di animali con valori medi di potassio al di sotto del range di riferimento pari al 19%. I valori medi più bassi di tale minerale sono stati riscontrati nell'allevamento A ($3,89 \pm 0,35 \text{ mmol/l}$) e in H ($3,70 \pm 0,34 \text{ mmol/l}$).

Entrambi questi allevamenti hanno mostrato una percentuale di animali inferiore al range di riferimento rispettivamente pari a 20% per l'allevamento A e 63% per quello H.

I valori di zinco sono risultati mediamente più elevati (differenza non significativa) negli allevamenti AM rispetto a quelli AP (Tabella 7) con differenze significative fra gli allevamenti. Si è osservata una differenza significativa ($P < 0,05$) tra gli allevamenti B appartenente al gruppo AM $13,96 \pm 2,05 \mu\text{mol/l}$ e H appartenente invece al gruppo AP $11,23 \pm 1,94 \mu\text{mol/l}$.

Nei due gruppi di allevamenti studiati non pare esserci alcuna differenza significativa per la ceruloplasmina; essa ha mostrato un livello elevato per molti animali in buona parte degli allevamenti visitati; questo si è tradotto quindi in medie di stalla in tutti i casi superiori al range di riferimento. Solo nell'allevamento C si sono avuti i valori più bassi ($2,36 \pm 0,68 \mu\text{mol/L}$).

Anche per l'aptoglobina, gli allevamenti AM rispetto a quelli AP hanno presentato una maggiore percentuale di animali con tassi di questo parametro più elevati del limite superiore del range di riferimento (32% vs 20% rispettivamente in AM e in AP). L' aptoglobina è risultata mediamente più elevata (ma non in maniera significativa) in AM rispetto ad AP. I valori più elevati di tale parametro sono stati riscontrati nell'allevamento D ($0,52 \pm 0,48 \text{ g/l}$), mentre quelli più bassi in H ($0,11 \pm 0,007 \text{ g/l}$).

Relativamente all'aspartato amino transferasi (AST/GOT), si sono osservati valori mediamente elevati con livelli di poco superiori (con differenza non significativa) nel gruppo AM rispetto a quello AP.

Il gruppo AM ha mostrato una più elevata percentuale di animali con valori medi superiori a quelli del range di riferimento (73% vs 61%). Anche per la concentrazione ematica di γ -glutamitransferasi (GGT), i valori riscontrati nel gruppo AM sono risultati mediamente più elevati (ns) rispetto a quelli del gruppo AP. Il gruppo AP ha però mostrato una più alta percentuale di animali che presentavano valori di tale parametro al di sopra del range di riferimento.

Analizzando i risultati ottenuti dalla determinazione della bilirubina, si osserva che non ci sono differenze significative tra i due gruppi di allevamenti studiati; il gruppo degli allevamenti con un punteggio SDIB più elevato ha mostrato la più alta percentuale di animali con un valore di bilirubina inferiore al range di riferimento (30% vs 17%) in AM rispetto ad AP.

Dall'analisi dei dati riportati in tabella, relativamente alla concentrazione ematica della fosfatasi alcalina, si osservano differenze tra gli allevamenti migliori e peggiori: il gruppo AM ha mostrato una percentuale di animali con un valore di tale parametro superiore a quello del range di riferimento più elevata rispetto a quella del gruppo AP (34% vs 17%).

Per quanto riguarda i valori medi di cortisolo (Figura 4) basale, è stato osservato che i valori più elevati di tale parametro sono stati rilevati nelle aziende appartenenti al gruppo AP (10,04 vs 6,99 ng/mL, $P = 0,08$); inoltre è stata osservata un'elevata variabilità tra gli allevamenti osservati e all'interno delle stesse. In tutti gli allevamenti controllati, è stata inoltre osservata una elevata percentuale di animali al di sopra del range di riferimento. E' stata osservata una significatività per l'interazione tra l'allevamento e la classificazione secondo il punteggio SDIB è risultata significativa ($P < 0,05$).

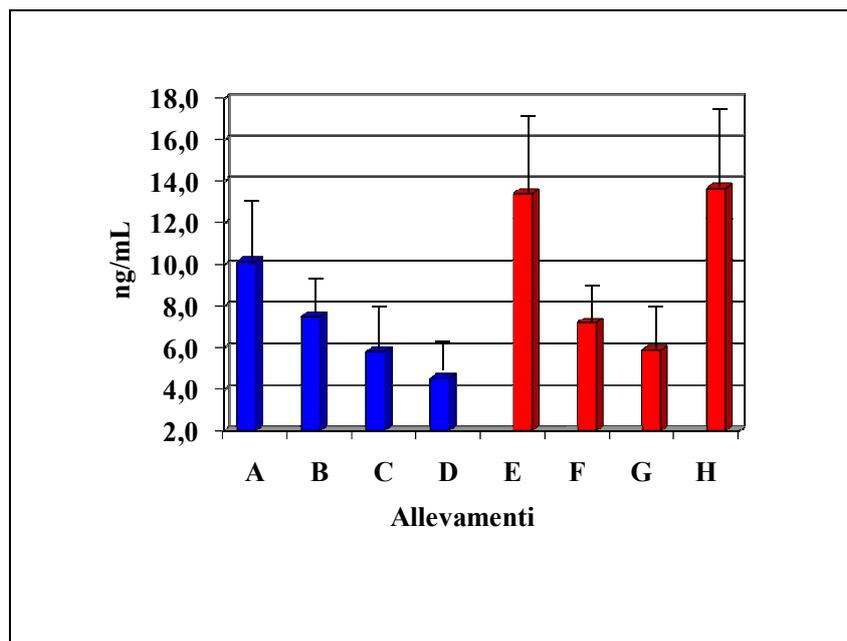


Figura 4. Valori medi di cortisolo (\pm ES) negli 8 allevamenti controllati ordinate in base al punteggio SDIB Totale a sinistra del grafico gli allevamenti con un punteggio SDIB > 75 (AM) (A, B, C e D) e a destra quelli con un punteggio SDIB < 75 (AP) (E, F, G e H).

Analisi delle componenti principali

I parametri individuali del profilo metabolico delle bovine appartenenti agli 8 allevamenti sono stati elaborati mediante l'analisi delle componenti principali.

Poiché le analisi statistiche con i parametri di cui è stato calcolato il logaritmo (GOT, GGT, aptoglobina e cortisolo), hanno mostrato gli stessi risultati ottenuti con l'analisi sulle variabili originali, vengono riportati solo quelli con queste ultime elaborazioni.

Dall'analisi degli autovalori della matrice di correlazione si osserva che la componente principale 1 (PC1) spiega il 19.4% della variabilità dei dati. Le prime due componenti (PC1 e PC2) spiegano il 31.9% della variabilità; la PC3 spiega il 10.2% della variabilità e la PC4 spiega l'8.8% della variabilità. Nel complesso le prime 4 componenti spiegano il 51.0% della variabilità dei dati.

Analizzando i valori degli auto vettori (che rappresentano gli elementi di un auto valore e che esprimono il legame tra la variabilità di partenza e la componente considerata attraverso dei pesi) della PC1 (Figura 5), si osserva che i parametri ematici che maggiormente contribuiscono al suo aumento sono le albumine (0.41), la fruttosamina (0.30), il magnesio (0.30) ed il colesterolo (0.25). Sempre per la PC1, tra i parametri che contribuiscono alla sua riduzione troviamo le globuline (-0.37), l'aptoglobina (-0.29), le proteine totali (-0.29) e la ceruloplasmina (-0.26).

Analizzando i valori degli autovettori della PC2 (Figura 6) si osserva che i parametri ematici che maggiormente contribuiscono al suo aumento sono il sodio (0.44), le proteine totali (0.35), le globuline (0.29) ed altri parametri con autovettore superiore a 0.2 (fosfatasi alcalina, calcio, fosforo, glucosio, ematocrito, GOT e urea). Tra i parametri che maggiormente contribuiscono alla sua diminuzione troviamo la bilirubina (-0.11).

Analizzando la PC3 (Figura 6) osserviamo che i parametri che maggiormente contribuiscono al suo aumento sono: il colesterolo (0.33), la bilirubina (0.29), il glucosio (0.28), la ceruloplasmina (0.28), la fruttosamina (0.25) e il cortisolo (0.33). Tra i più importanti parametri che contribuiscono alla sua diminuzione troviamo: l'urea (-0.26), lo zinco (-0.26), il fosforo (-0.22) ed il cloro (-0.20).

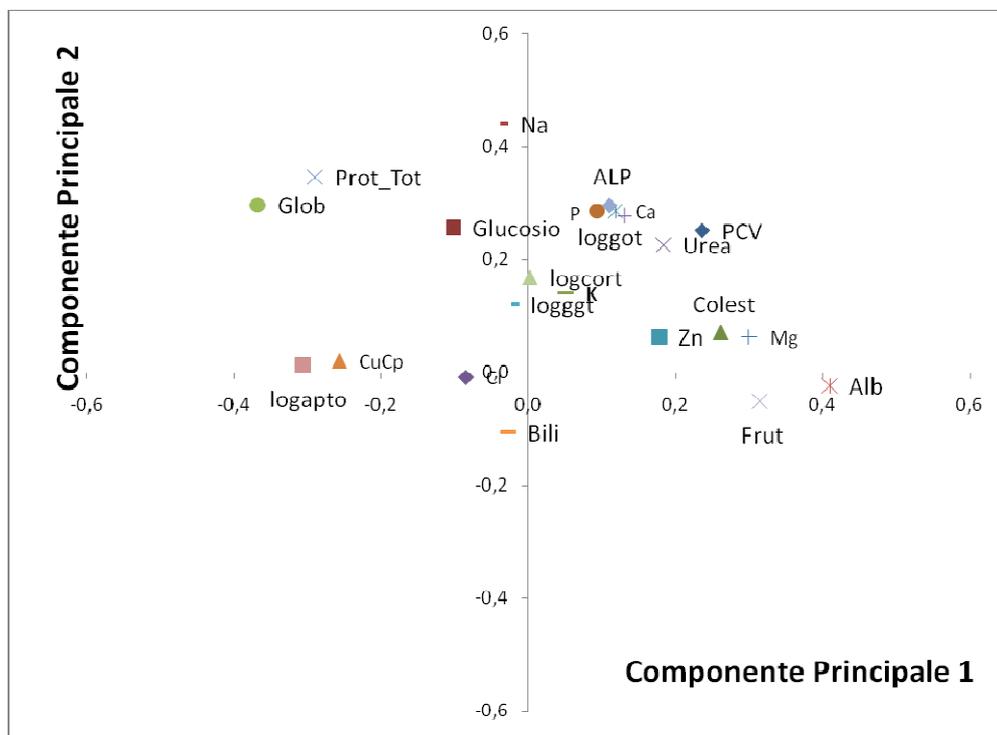


Figura 5 Loading plot che descrive la relazione tra i parametri ematici del profilo metabolico derivanti dai valori degli autovettori della componente principale 1 (PC1) e 2 (PC2).

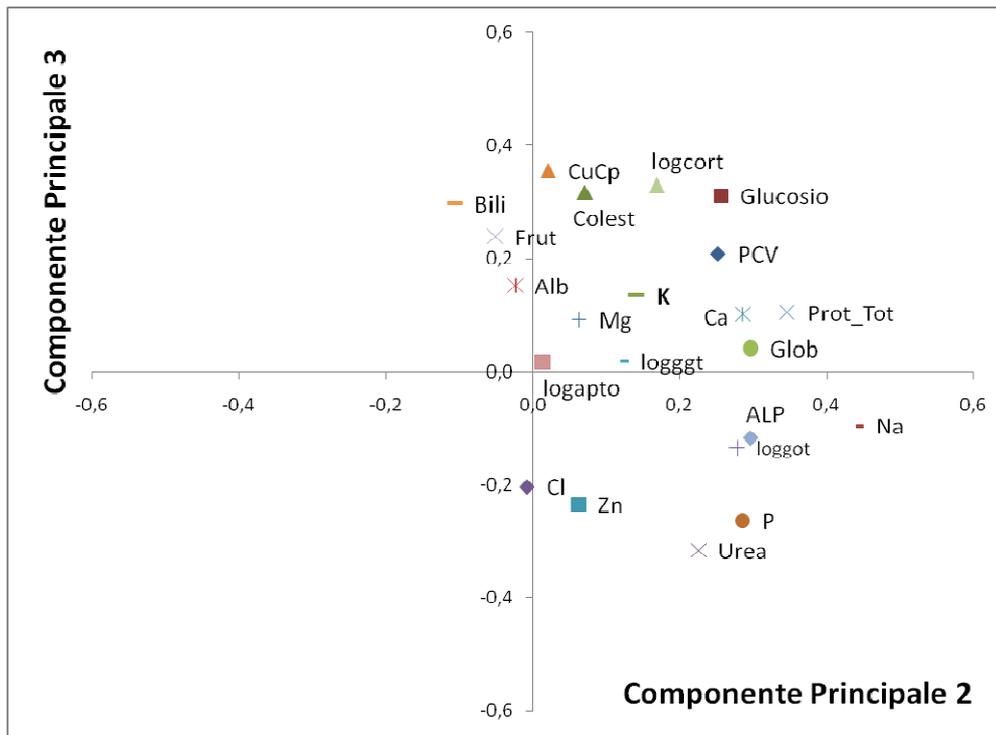


Figura 6 Loading plot che descrive la relazione tra i parametri ematici del profilo metabolico derivanti dai valori degli autovettori della componente principale 2 (PC2) e 3 (PC3).

All'esame dei valori delle prime tre componenti principali, calcolati per le singole bovine emerge una notevole dispersione entro ogni allevamento ed una notevole sovrapposizione fra gli animali dei diversi allevamenti (Figura 7 e 8). Dall'esame delle figure si può osservare che la PC3 tende a separare le bovine dei 4 allevamenti migliori dalle bovine dei 3 dei quattro allevamenti peggiori . per la PC2 si osserva una tendenziale separazione della 4 allevamento delle AP dalle aziende AM.

Confusa risulta invece la separazione degli allevamenti in base alla PC1.

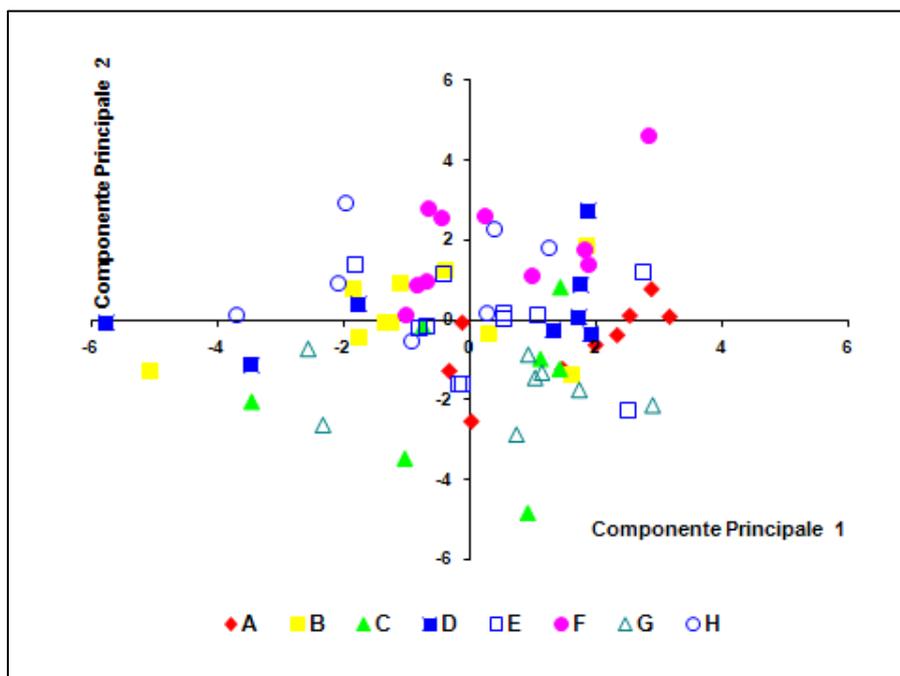


Figura 7. Componente Principale 1 e 2 (P1 e P2) ottenuta con l'Analisi delle Componenti Principali sui dati del sangue (ciascun punto rappresenta una bovina, differenti simboli e colori rappresentano i differenti allevamenti controllati).

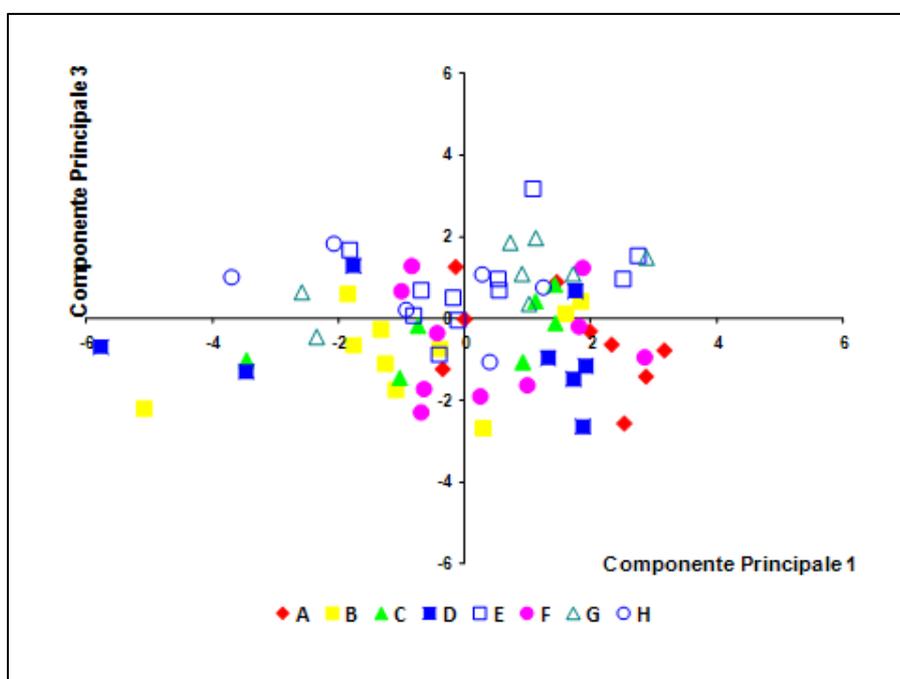


Figura 8. Componente Principale 1 e 3 (P1 e P3) ottenuta con l'Analisi delle Componenti Principali sui dati del sangue (ciascun punto rappresenta una bovina, differenti simboli e colori rappresentano i differenti allevamenti controllati).

Elaborazione mediante programmazione lineare

Con l'applicazione del modello di programmazione lineare (PL), sono stati definiti i pesi relativi dei singoli indicatori nel modello SDIB. Questi nuovi pesi relativi, sono stati definiti in modo tale da ottenere un nuovo punteggio complessivo di benessere di ogni allevamento in accordo con la graduatoria stabilita in base alla cortisolemia o dei parametri infettivo-infiammatori. I nuovi pesi relativi ed i punteggi ottenuti sono riportati nella Tabella 8.

Si è potuto osservare che la divisione degli otto allevamenti studiati nei due gruppi: allevamenti, con un punteggio superiore a 75 (AM) e allevamenti con un punteggio inferiore a 75 (AP) è risultato nel complesso simile a quella ottenuta applicando il modello SDIB originale; solo due allevamenti A e G hanno scambiato la loro posizione nella suddivisione.

Per quanto riguarda i “pesi relativi” dei vari indicatori si osserva che i nuovi valori definiti con la PL hanno comportato nel complesso un ridimensionamento del cluster alimentazione a favore del cluster allevamento quando è stato utilizzato come riferimento il cortisolo, a favore del cluster animale quando sono stati utilizzati i parametri infettivo infiammatori (zinco, calcio, albumine, ceruloplasmina, globuline, colesterolo, ematocrito e aptoglobina) come riferimento.

Nello specifico del cluster animale sono aumentati i pesi relativi per: l'aspetto esteriore dell'animale, la presenza di patologie, la composizione del latte (rappresentata dal contenuto di grasso e proteine) e l'interazione sia tra l'animale e l'uomo e sia quella tra animale e ambiente (Tabella 8).

Tabella 8. Pesì relative di ciascun aspetto, componente o cluster calcolati sia con il modello SDIB originale che con il modello di programmazione lineare (LP).

CLUSTER	COMPONENTE	ASPETTO	Pesi relativi _a	Pesi relativi _b	Pesi relativi _c
ALLEVAMENTO	Ricoveri e impianti	Strutture	6	9,04	4,5
		Disponibilità di spazi	4	5,6	7,86
		Condizioni microclimatiche	4	4	6
		Impianti	4	4,04	1,9
	Gestione	Ricoveri e impianti	6	4,2	1,9
		Gestione degli animali	6	6,92	7,95
	PUNTEGGIO TOTALE CLUSTER ALLEVAMENTO			30	33,8
ALIMENTAZIONE	Alimenti	Modalità conservazione	4	3	1,5
		Qualità	10	10	7,5
		Gestione	4	4	8
	Razioni	Prima del parto	5	5	5
		Dopo il parto	7	7	3,5
	PUNTEGGIO TOTALE CLUSTER ALIMENTAZIONE			30	29
ANIMALE	Fisiologia, salute e riproduzione	Aspetto esteriore	5	4,44	5,2
		Funzionalità del digerente	4	3,01	1,5
		Mammella	4	2,6	2,29
		Arti e piedi	4	2,13	0,85
		Riproduzione	3	3,99	3,3
		Malattie	4	4	6
	Performance Produttive	Produzione di latte	4	4	3,18
		Composizione di latte	4	4	9
	Behaviour	Behaviour	3	3	6
		Interazione animale-ambiente	5	6,03	7,07
	PUNTEGGIO TOTALE CLUSTER ANIMALE			40	37,2
PUNTEGGIO TOTALE			100	100	100

a = Valori dei pesi relativi del modello SDIB originale che ha prodotto i seguenti punteggi complessivi: Allevamento A: 78,45; Allevamento B: 77,05; Allevamento C: 76,44; Allevamento D: 75,32; Allevamento E: 74,7; Allevamento F: 72,16; Allevamento G: 70,9 e Allevamento H: 70,39;

b, c = Valori dei pesi relative calcolati usando il modello di Programmazione Lineare per aggregare i punteggi degli indicatori in un punteggio globale complessivo in accordo con la classificazione degli allevamenti in base alla media dei valori di cortisolo (b), in questo caso i nuovi punteggi ottenuti sono stati: Allevamento A: 74,3; Allevamento B: 76,00; Allevamento C: 76,00; Allevamento D: 76,5; Allevamento E: 74,4; Allevamento F: 73,5; Allevamento G: 75,00 e Allevamento H: 70,5; o sulla base dei marcatori della condizione infiammatoria (c), in questo caso i nuovi punteggi globali ottenuti sono: Allevamento A: 74,00; Allevamento B: 79,43; Allevamento C: 76,5; Allevamento D: 76,00; Allevamento E: 74,00; Allevamento F: 72,00; Allevamento G: 76,5 e Allevamento H: 76,00.

9.5 DISCUSSIONE

Con il modello di campo per la valutazione del benessere, utilizzato in questa ricerca in 8 allevamenti di bovine da latte, abbiamo evidenziato che in 4 di essi (gruppo AM, allevamenti che hanno ottenuto un punteggio complessivo di valutazione del benessere superiore a 75) il benessere è risultato accettabile. Infatti in questi 4 allevamenti il punteggio complessivo di benessere elaborato dal modello superava la soglia minima fissata dagli autori del modello stesso. I punteggi ottenuti con gli indicatori diretti (presenti nel cluster animale) hanno mostrato un sostanziale accordo con i punteggi globali. Infatti negli allevamenti AM rispetto a quelli AP (allevamenti che hanno ottenuto un punteggio complessivo di valutazione del benessere inferiore a 75) si sono osservati mediamente punteggi più elevati per questo cluster. Al contrario i punteggi ottenuti con gli indicatori indiretti, in particolare per quelli del cluster allevamento, non sono sempre risultati in sintonia con i punteggi globali e con i punteggi del cluster animale. Infatti si è osservata un'ampia variabilità nel punteggio del cluster allevamento sia all'interno degli allevamenti migliori che all'interno dei peggiori, con allevamenti con un punteggio tra i più elevati nel cluster allevamento e tra i più bassi nel cluster animale e viceversa. Questo indicherebbe che il benessere valutato in base agli indicatori indiretti (presenti nel cluster allevamento) fornirebbe indicazioni non sempre in sintonia con quelle ottenute con gli indicatori diretti (cluster animale). A determinare queste differenze sembra essere stata soprattutto la componente strutture ed impianti del cluster allevamento. Per questa componente infatti, si è osservato un punteggio medio inferiore nella aziende AM rispetto a quelle AP, con una notevole discordanza fra il punteggio di questa componente ed il punteggio del cluster animale dei singoli allevamenti. Al contrario la componente gestione, in particolare la gestione degli animali, del cluster allevamento ha mostrato punteggi più in sintonia con quelli del cluster animale.

Al riguardo è noto che le informazioni riguardanti il sistema allevamento sono importanti ai fini del benessere perché forniscono indicazioni circa le risorse per gli animali e le possibilità di soddisfacimento delle loro esigenze. Un sistema di allevamento, tuttavia, può essere applicato in molti modi e queste modalità di applicazione possono influenzare non poco il benessere (Fregonesi e Leaver, 2001). Occorre infine ricordare che questi indicatori indiretti rilevano la presenza di fattori che sono causa di stress, tuttavia benessere non significa assenza di fattori di stress, ma semplicemente che l'organismo si sa adattare ad essi. La tolleranza degli animali a questi numerosi fattori di stress è ritenuta essere proporzionale all'importanza ed all'intensità del fattore stressante, ma contemporaneamente alla risposta del singolo animale che dipende da fattori genetici, esperienza individuale, ecc. Questo rende estremamente difficile dare un giudizio preventivo sulle conseguenze che i vari fattori di stress possono avere sugli animali (Bertoni,

1994). Ciò rende ragione della necessità di non limitarsi ad analizzare i punti critici dei sistemi di allevamento in relazione alle “5 libertà”; ma, come è stato anticipato da Grandin (1997): “occorre un’accurata valutazione delle reazioni degli animali, una combinazione tra osservazioni dei comportamenti e misure fisiologiche, al fine di elaborare una misurazione corretta del livello di discomfort dell’animale”.

Come indicato precedentemente si è riscontrata una buona sintonia fra punteggio complessivo e punteggio ottenuto con gli indicatori diretti (cluster animale). Spiccano soprattutto le differenze in termini di performance fra allevamenti AM ed AP. Infatti negli allevamenti AM si è osservata una produzione di latte sistematicamente più elevata ed una fertilità spesso migliore rispetto agli allevamenti AP. Questo risultato tende a smentire la convinzione molto diffusa che alla base di una ridotta fertilità della bovina da latte nel post parto vi sia una condizione di stress collegata ad una elevata produzione di latte. E’ pur vero però, che le bovine con maggiore produttività sono le più esposte e meno tolleranti a regimi di conduzione non opportuni, soprattutto nel caso in cui si considera la presenza di eventuali errori dietetici, conseguenti disordini metabolici e insorgenza di un prolungato bilancio energetico negativo (Roche et al., 2000), in quanto sono proprio questi ultimi che influenzano negativamente la fertilità della bovina da latte.

Pertanto si può dedurre che non è la produzione in sé che determina una riduzione della fertilità, ma ci sono altri fattori che devono essere opportunamente studiati tra cui l’alimentazione ed il comfort ambientale; quindi controllando questi, si può garantire un benessere accettabile all’animale ed al tempo stesso una produzione elevata.

Nel set di indicatori per la valutazione del benessere in allevamento non si possono escludere indicatori relativi all’alimentazione dal momento che una delle cinque libertà (FAWC, 1993) è legata alla libertà dalla fame, dalla sete e dalla malnutrizione. Tuttavia l’aspetto alimentazione è spesso trascurato nei modelli di valutazione del benessere o non è considerato affatto come nel modello di Bartussek (1999). Al contrario l’acquisizione di rilevanti elementi di giudizio in merito all’alimentazione, può essere di grande aiuto nell’individuare alcune delle cause di una riduzione del benessere. Infatti è stato accertato che l’alimentazione può influenzare negativamente la condizione di salute e la fertilità degli animali, nonché la produzione di latte e la sua qualità. Nel modello SDIB di valutazione del benessere utilizzato in questa ricerca, il cluster relativo all’alimentazione è stato valutato nel dettaglio, prendendo in esame numerosi aspetti riguardanti sia gli alimenti che le razioni.

I risultati ottenuti con questi indicatori indiretti del cluster alimentazione sono stati nel complesso in sintonia con le differenze osservate in termini di punteggio complessivo fra gli

allevamenti AM ed AP. Infatti, anche per questi indicatori indiretti, si è osservata un'ampia variabilità entro gli allevamenti migliori e quelli peggiori.

In merito alla conservazione e alla gestione degli alimenti, nonché alle loro caratteristiche igienico-sanitarie e nutrizionali non si sono riscontrate situazioni analoghe, ma nel complesso soddisfacenti in tutti gli allevamenti. Al contrario le razioni utilizzate sia prima che dopo il parto in tutte le aziende oggetto della ricerca valutate in base al loro contenuto in sostanza secca ingerita, al corretto apporto di energia e proteine grezze, nonché per il contenuto in amido e NDF non sempre sono risultate ottimali.

A questo punto è necessario premettere che le caratteristiche chimico-nutrizionali delle razioni per le bovine in lattazione, elaborate con il modello SDIB sulla base della valutazione sensoriale degli alimenti, sono risultate in buona sintonia con quelle elaborate sulla scorta delle analisi di laboratorio degli alimenti. Al contrario, per le razioni delle bovine in asciutta, le discrepanze sono risultate maggiori, soprattutto per quanto riguarda il contenuto in proteine della razione. Questo sembra essere attribuibile alla maggiore difficoltà della stima del loro contenuto nei fieni di graminacee, alimento che rappresenta spesso la base della razione per le bovine in asciutta. Quindi errori nella stima delle caratteristiche chimico-nutrizionali di questo alimento si riflettono pesantemente sulle corrispondenti caratteristiche della razione. Al contrario, per le bovine in lattazione, la razione è spesso a base di mais silo (solo in un allevamento la base foraggera era costituita da foraggi essiccati) e ha mostrato una percentuale di concentrati ben più importante. La stima delle caratteristiche chimico-nutrizionali di insilato di mais e concentrati, a partire dalla valutazione sensoriale e con l'ausilio di un database, risulta meno difficoltosa. Ne consegue quindi una più adeguata stima delle caratteristiche chimico-nutrizionali delle razioni.

Nei diversi allevamenti controllati, considerando le razioni prima del parto, si è osservato che tutti i due gruppi di aziende hanno mostrato un punteggio relativamente basso, osservando talora una concentrazione eccessiva di energia e variabile di proteine. Viceversa in lattazione, la maggiore concentrazione energetica è in parte attribuibile ai lipidi. Infatti, è stato da tempo studiato come l'apporto supplementare di lipidi nel corso del periodo di transizione sia utilizzato per aumentare la quantità di energia della dieta per evitare l'insorgenza dell'acidosi e di tutte le problematiche ad essa connesse ruminale derivante da un eccesso di energia fermentescibile nella razione. Diversi autori hanno quindi sottolineato l'importanza dei lipidi sia come principi che apportano energia ma anche per il ruolo nutrizionale che essi svolgono (un esempio può essere dato dalla funzione degli acidi grassi $\omega 3$ di modulazione della risposta immunitaria riducendo la sintesi degli eicosanoidi pro infiammatori a favore di quelli anti-infiammatori (Bertoni e Trevisi, 2001). (Drackley, 1999; Bertoni e Trevisi, 1997).

Ora, tutti sanno quali sono i problemi di una bovina che arriva al parto troppo grassa: il grasso eccessivo è la causa di disturbi metabolici (chetosi, steatosi) e può contribuire allo sviluppo di problemi al momento del parto (distocia, ritenzione di placenta). Tale risultato è stato confermato dall'analisi dei dati relativi al Body Condition Score (BCS, ADAS, 1986), che consente di valutare lo stato d'ingrassamento degli animali tramite un'osservazione visiva e una palpazione in precise regioni anatomiche che permettono di determinare con una certa accuratezza l'entità dei depositi adiposi. Le bovine in asciutta sono apparse con BCS eccessivamente elevato in molti degli allevamenti controllati, in particolare in alcuni allevamenti AP, probabilmente a causa dell'eccesso energetico della razione e dell'eccessiva lunghezza del periodo di asciutta, a sua volta dettato dai lunghi intervalli parto-concepimento.

Nelle bovine ad inizio lattazione, invece, si è osservata una situazione opposta, ovvero in molti casi, le bovine apparivano eccessivamente magre; ciò potrebbe confermare quanto osservato da Drackley (1999), e cioè che una dieta ricca prima del parto è causa di peggioramento del bilancio energetico nelle prime fasi di lattazione.

E' accertato che il recupero del peso durante le ultime settimane di lattazione è più efficiente rispetto alla fase dell'asciutta, questo non deve peraltro essere visto come un periodo di recupero delle riserve corporee, ma una fase in cui l'animale sarà in grado di garantire lo sviluppo del feto, rinnovare i tessuti e gli organi molto sollecitati durante la lattazione (apparato mammario). Le eccessive condizioni nutrizionali delle bovine in asciutta talora osservate negli allevamenti AP possono essere state favorite dalle razioni utilizzate in lattazione, rispetto alla produzione di latte e dall'interparto lungo. Infatti negli allevamenti AP la minore produzione di latte, il più lungo interparto, unitamente all'utilizzazione di un'unica miscela *unifeed* per tutte le bovine in lattazione può facilmente comportare un eccessivo accumulo di riserve nelle bovine in fine lattazione. Tale situazione è favorita inoltre dal contenuto energetico e di amido delle razioni, mediamente più elevato negli allevamenti AP rispetto ad AM, nonostante la minore produzione di latte.

Al contrario negli allevamenti AM, in particolare in A e C, la maggiore produzione di entrambe le mandrie registrata durante tutta la lattazione ha comportato una più adeguata copertura dei fabbisogni energetici durante tutta la lattazione, anche in conseguenza della migliore fertilità con un più breve intervallo interparto. Tutto ciò dimostra che il giudizio sulle razioni in uso non si deve restringere a quel momento, ma si deve estendere alle possibili conseguenze nelle fasi successive (talora piuttosto lontane).

Nel complesso i risultati ottenuti con la valutazione degli alimenti e delle razioni possono solo in parte giustificare le differenze riscontrate in termini di performance fra allevamenti AM ed AP. I

dati ottenuti sembrano inoltre evidenziare che, in alcune fasi del ciclo produttivo della bovina, le razioni in AP siano risultate meno adeguate rispetto ad AM anche perché non sempre sono state adeguate al più ridotto livello produttivo, aggravando così la situazione.

E' noto che la paura degli animali nei confronti delle persone può essere una fonte di stress e può provocare dei cali di produzione (Hemsworth et al., 1995). Dai nostri rilievi, effettuati mediante gli indicatori comportamentali, abbiamo osservato una migliore interazione uomo-animale negli allevamenti AM rispetto a quelli AP; nei primi infatti, si è mediamente osservato meno timore da parte degli animali al momento dei nostri rilievi sulla mandria.

E' stata dedicata particolare attenzione a questi aspetti poiché sono influenzati da numerosi fattori tra cui: la predisposizione genetica, le condizioni abitative, l'esperienza, la qualità e la quantità di contatti umani e delle procedure di movimentazione e manipolazioni degli animali (Hemsworth et al., 1998). Da numerosi studi è emerso che animali che presentano paura nei confronti degli esseri umani sono spesso avvezzi ad una manipolazione inadeguata da parte dell'uomo, questo spesso determina una reazione inappropriata degli animali nei confronti delle persone. Quindi, il modo in cui gli animali sono gestiti dai loro allevatori, e la paura che essi possono sviluppare nei confronti delle persone, hanno un grande impatto sul loro benessere, a prescindere dalle condizioni dell'ambiente in cui vivono (strutture, impianti, attrezzature, ecc.).

La paura degli animali nei confronti delle persone può essere una grande fonte di stress, e può di conseguenza provocare un immediato aumento della frequenza cardiaca, un calo produttivo, maggiori difficoltà alla mungitura, può favorire una maggiore perdita di peso durante le prime settimane dopo il parto, un aumento del rischio di lesioni ed una maggiore incidenza di zoppie (Breuer et al., 1997; Hemsworth et al., 1995). E' infatti noto come queste possano rappresentare un rilevante problema economico negli allevamenti di vacche da latte sia per il benessere che per la produttività (Hemsworth et al., 1995). Per limitare le conseguenze di una gestione non corretta degli animali, ridurre il loro timore e di conseguenza evitare una riduzione del benessere, sarebbe opportuno abituare l'animale ad una manipolazione delicata fin dalla giovane età, sia per abituare l'animale al contatto con l'uomo, (Boissy and Bouissou, 1988) e abituare i giovani animali alle operazioni di mungitura.

Attraverso gli indicatori comportamentali si è osservato negli allevamenti AM, rispetto a quelli AP, una migliore interazione animale-ambiente, soprattutto in termini di una più adeguata utilizzazione delle aree a disposizione degli animali. Questo sembrerebbe indicare un maggiore disagio degli animali degli allevamenti AP nei confronti dell'ambiente in cui vivono, evidenziando quindi un minore comfort. Questa situazione può interferire con lo svolgimento delle varie attività che l'animale normalmente compie nel corso della giornata. Grant (2006) ha

proposto per le bovine più produttive un tempo ottimale di 14 h/d per il riposo. Una riduzione del tempo dedicato al riposo in decubito comporta un aumento dei problemi podali, una riduzione del tempo di ruminazione, una riduzione dell'attività alimentare e nel complesso un peggioramento dello stato generale di salute (Grant, 2006). Lo stesso autore suggerisce che un aumento di 1 h per giorno dedicato al riposo comporterebbe mediamente un aumento di 1 kg di latte per giorno. In base ai nostri controlli non siamo certo in grado di definire il tempo dedicato alle varie attività da parte degli animali, tuttavia l'aver osservato una migliore utilizzazione dell'area di riposo negli allevamenti AM rispetto ad AP lascia presupporre che il tempo dedicato al riposo sia stato maggiore nei primi, con tutti i possibili effetti positivi prima esposti. Questa situazione si riflette positivamente sul benessere e sulla produzione di latte.

In base ai risultati esposti sembra che negli allevamenti AP vi siano state condizioni più favorevoli per l'insorgenza di malattie e queste, provocando condizioni di malessere, abbiano ulteriormente aumentato la suscettibilità ad esse (Bertoni, 1999). I nostri rilievi hanno evidenziato attraverso l'ispezione degli animali una maggiore frequenza di problemi podali in AP, almeno in uno di questi allevamenti.

Dall'esame dei dati ottenuti con i controlli per il pagamento del latte in base alla qualità abbiamo riscontrato valori di cellule somatiche tendenzialmente elevati in AP e superiori rispetto ad AM. Dal momento che le cellule somatiche sono utilizzate come specchio dello stato sanitario della mammella, questi valori lasciano presupporre uno stato sanitario della mammella non ottimale negli allevamenti AP. Al contrario non abbiamo riscontrato differenze nei parametri utilizzati per giudicare la presenza di eventuali anomalie digestive. Infatti l'attività di ruminazione (Beauchemin, 1991), le caratteristiche e la consistenza delle feci (Skidmore et al., 1996) sono risultate sostanzialmente nella norma sia nel gruppo AP che in quello AM. Tra le malattie del puerperio abbiamo effettuato controlli solo sulle malattie più oggettivamente rilevabili (collasso puerperale, ritenzione di placenta e dislocazione dell'abomaso). In tutti gli allevamenti non è stata segnalata un' elevata incidenza di queste malattie.

Riguardo alle condizioni sanitarie delle mandrie si sono registrate delle differenze tra i due gruppi di allevamenti controllati relative ad alcuni aspetti valutati sistematicamente dall'APA (contenuto in cellule somatiche). Al contrario non sono state riscontrate differenze per gli aspetti controllati e registrati autonomamente dall'allevatore (le patologie presenti in allevamento, le lesioni cutanee, le laminiti, le condizioni esterne del corpo). La difficoltà nel rilevare adeguatamente le condizioni sanitarie degli animali attraverso l'esame delle registrazioni effettuate è già stata segnalata da Sørensen et al. (2001). Lo stesso autore suggerisce di basare i controlli dello stato sanitario attraverso l'ispezione degli animali, al pari di quanto effettuato nel

modello SDIB. Tuttavia anche con l'ispezione degli animali, che comporta un accurato esame esteriore, prevista nel modello SDIB su animali all'inizio della lattazione, in fase avanzata della lattazione ed in asciutta è probabilmente difficile rilevare l'entità di alcune malattie del puerperio, soprattutto quando in forma poco manifesta. Una maggiore presenza di problemi sanitari si riflette anche sullo stato nutrizionale degli animali, sulle performance produttive e riproduttive, sulla qualità del latte. Questi dati sono più facilmente ed oggettivamente misurabili.

Validazione del modello SDIB

Per la validazione del modello SDIB, nella presente ricerca sono stati effettuati, in parallelo ai rilievi previsti in questo modello, controlli su parametri endocrino metabolici nelle bovine in fase iniziale di lattazione. Per molti dei parametri ematici controllati si è osservata una elevata percentuale di animali con valori al di fuori del range di riferimento (Bertoni et al., 2000), sia negli allevamenti AM e sia in quelli AP. La variabilità di questi parametri è influenzata da numerosi fattori (Commissione ASPA, 1999), con una relazione variabile con le condizioni di benessere degli animali. La relazione fra il benessere-malessere e le variabili ematiche utilizzate sono riportati in nostre precedenti ricerche. Particolarmente studiato è stato lo “stress da malattia” ed i parametri di tipo infettivo-infiammatorio ad esso connessi. Infatti, secondo Dantzer et al. (2006) le citochine pro-infiammatorie causa di tale “stress da malattia” e dalle variazioni ematiche, oltre a ridurre il benessere fisico ridurrebbero anche il benessere mentale. All'origine di queste situazioni ci sono, oltre alle malattie infettive e parassitarie, anche i traumi, le lesioni e la malnutrizione. La nostra attenzione si è quindi focalizzata principalmente su questi parametri infettivo-infiammatori, unitamente al cortisolo (ed alla glicemia), comunemente studiato nelle condizioni di stress cronico.

Dai nostri risultati, la glicemia è risultata più elevata nel gruppo di allevamenti AP, quelli che hanno ottenuto un punteggio SDIB più basso; inoltre in questo gruppo di allevamenti tutti gli animali controllati hanno mostrato un livello di glicemia superiore al massimo dei limiti di riferimento. Al contrario negli allevamenti AM la percentuale di animali con valori superiori al limite massimo del range è stata inferiore (63%) anche se pur sempre elevata, mentre negli allevamenti AP essa è risultata pari a 100. Questa iperglicemia può essere riscontrata in risposta a differenti tipi di stressors (Moberg, 1985); infatti, come è noto, durante una risposta ad uno stress il sistema nervoso centrale e l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene sono attivati e molti ormoni sono aumentati con brevissimo lasso di tempo; tra questi è necessario ricordare l'aumento delle catecolamine che determinano un aumento della concentrazione plasmatica di glucosio.

Tuttavia, il livello di glucosio nel sangue non è un indicatore molto affidabile dell'intensità dello stress cronico negli animali poiché il suo livello può essere influenzato da numerosi altri fattori

(Scholtz, 1990). Se infatti aumenti considerevoli di questo parametro si possono realizzare in condizioni di stress acuto (es. cattura per il prelievo) e ben più modesti a seguito di continue situazioni di stress cronico (ambiente non confortevole o personale inadatto), ci sono al contrario cause di diminuzione della concentrazione plasmatica di glucosio fra cui le temperature elevate. Ciò sembra essere imputabile sia al calo del cortisolo, sia alla diminuzione dell'ingestione che si verifica durante un periodo di temperature elevate (Bertoni, 1998). I livelli ematici di glucosio sono altresì influenzati dalla composizione della dieta in conseguenza del diverso andamento delle fermentazioni ruminanti e quindi della diversa quantità prodotta di acido propionico che rappresenta il principale precursore del glucosio nei ruminanti.

Forse per le predette ragioni di disturbo, i risultati del glucosio non sono stati confermati dai valori di fruttosamina nel plasma. Infatti per questo parametro non si sono osservate differenze fra allevamenti AM ed AP. La fruttosamina viene utilizzata come indicatore della glicemia media delle ultime 2-3 settimane (Jensen, 1992; Kawamoto et al., 1992). In base ai pochi lavori riportati in bibliografia sui bovini, i valori ottenuti in questa ricerca sembrano tendenzialmente elevati, confermando così, almeno in maniera parziale, l'elevata glicemia.

Diverse possono essere le ipotesi per giustificare la discrepanza fra glicemia e fruttosamina rilevata fra allevamenti AP ed AM. La più alta glicemia degli animali negli allevamenti AP può anche essere in parte frutto di un maggiore stress per il prelievo (essendo gli animali più suscettibili). Questo stress potrebbe infatti comportare un aumento della glicemia ma non della fruttosamina che dipende dalla glicemia delle ultime 2-3 settimane.

Si potrebbe ipotizzare anche un maggiore calo della glicemia nelle prime settimane di lattazione negli animali degli allevamenti AP in grado di mascherare il successivo aumento per effetto dei fattori di stress a cui gli animali sono sembrati esposti. Questa ipotesi potrebbe tuttavia giustificare solo in parte le differenze, dal momento che i valori di glicemia rimarrebbero bassi solo nel primo mese di lattazione (Commissione ASPA, 1999) e quindi non sembrerebbero in grado di influenzare la fruttosamina quando i prelievi verrebbero effettuati dopo i primi 45-50 giorni di lattazione. I nostri prelievi sono stati effettuati tra il 30° ed il 120° giorno di lattazione.

Numerosi autori hanno riportato che elevati livelli di cortisolo sembrano essere mantenuti quando c'è una difficoltà nell'animale di ristabilire l'omeostasi o dopo uno stress ripetuto. L'interpretazione dei valori basali di cortisolo è tuttavia complessa ed in letteratura vengono riportate interpretazioni discordanti. Broom (1988) ha osservato che c'è una iper-reattività negli animali in conseguenza del *challenge* con ACTH e questo supporta la relazione tra elevati livelli basali di cortisolo e stress cronico; mentre Weiss et al. (2004) considera questo fenomeno vero nel maiale ma non nella bovina; inoltre l'interpretazione dei livelli basali di cortisolo non risulta

facile poiché dipende da numerosi fattori: ritmo circadiano (Möstl and Palme, 2002); modalità di prelievo (Negrão et al., 2004); mungitura (Bertoni et al., 2005; Rushen et al., 2007); livello di abitudine (von Borell, 2001; Smith and Dobson, 2002); la produzione di altri ormoni (per esempio la vasopressina, Rushen et al., 2007); le infezioni come la presenza di endotossine (Rushen et al, 2007).

Relativamente ai valori medi di cortisolo basale, i nostri risultati hanno mostrato che i valori più elevati di tale parametro sono stati rilevati nelle aziende appartenenti al gruppo AP (10,04 ng/mL). Tuttavia il cortisolo è risultato elevato solo in due allevamenti AP. Negli altri due i valori non sono risultati elevati, quindi simili a quelli evidenziati negli allevamenti AM. Questi risultati probabilmente indicano una possibile condizione di stress cronico in alcuni allevamenti AP.

Per quanto concerne i parametri infettivo-infiammatori, se ne discute all'interno di quanto emerso dall'analisi delle componenti principali si è ottenuto con la componente 3 (PC3, i parametri ematici che la compongono sono: colesterolo, bilirubina, glucosio, ceruloplasmina, fruttosamina, cortisolo, urea, zinco, fosforo e cloro) una parziale separazione fra animali degli allevamenti AM rispetto a quelli degli allevamenti AP. All'aumento della PC3 hanno contribuito il glucosio, il cortisolo e la fruttosamina. Valori più elevati di questa componente sono stati prevalentemente riscontrati negli animali degli allevamenti AP. Al contrario valori più bassi sono stati prevalentemente riscontrati negli allevamenti AM. In base a questa componente sembrerebbe quindi che l'aumento del glucosio, del cortisolo e della fruttosamina sia associato con una riduzione delle condizioni di benessere ottenuta con il modello SDIB. A questa componente hanno contribuito anche i valori di ceruloplasmina (contributo positivo) e di zinco (contributo negativo). Quindi in base a questi parametri sembra che l'aumento della ceruloplasmina (Commissione ASPA; 1999) e la riduzione dello zinco (Commissione ASPA; 1999), entrambi tipici di situazioni infettivo- infiammatorie siano associati ad una riduzione del benessere rilevata con lo SDIB. Fra le altre proteine di fase acuta del processo infiammatorio, un certo peso sulla PC3 è da attribuire al colesterolo (contributo positivo). Il contributo del colesterolo, utilizzato come indice delle lipoproteine e classificabile fra le proteine negative di fase acuta, è risultato tuttavia dello stesso segno della ceruloplasmina, considerata una proteina positiva di fase acuta. Il colesterolo tuttavia è frutto di molti altri fattori di variazione, fra cui l'effetto distanza dal parto e l'ingestione di grassi (Commissione ASPA, 1999). Probabilmente le sue variazioni andrebbero preferibilmente valutate nel primo mese di lattazione come si vedrà nella successiva ricerca.

Sempre dall'analisi delle componenti principali abbiamo riscontrato che la PC1 (i parametri ematici che la compongono sono: albumine, fruttosamina, magnesio, colesterolo, globuline aptoglobina, proteine totali e ceruloplasmina) è risultata prevalentemente influenzata dalle proteine positive e negative di fase acuta. Alla sua diminuzione contribuiscono l'aumento dell'aptoglobina, la ceruloplasmina ed anche delle globuline (insieme alle proteine totali). Al suo aumento contribuiscono il calo delle albumine ed del colesterolo, oltre all'aumento del magnesio e della fruttosamina. Quindi, poiché questa componente comprende alcuni dei parametri ematici che sono maggiormente connessi con il benessere animale, un suo aumento determinerà una condizione di benessere più elevata, mentre una sua riduzione la situazione opposta.

L'inclusione della fruttosamina si può forse spiegare per la relazione riscontrata fra questo parametro con il livello di albumine. La PC1 non ha tuttavia mostrato relazioni con lo stato sanitario rilevato con lo SDIB, né con i risultati del punteggio del cluster animale né con il punteggio complessivo rilevato con lo SDIB.

In base a questi risultati sembra ulteriormente confermato che anche per la validazione dei modelli di valutazione del benessere non ci si può basare sul singolo parametro o su pochi parametri che prendono in considerazione solo un aspetto del benessere. Infatti l'aver riscontrato una relazione fra la PC3, principalmente frutto della combinazione di fattori di stress di tipo psico-fisico (quali per esempio quelli derivanti da cuccette non confortevoli, o da una relazione uomo-animale non adeguata) e stress da malattia, con la valutazione del benessere effettuata con lo SDIB sembra suffragare questa ipotesi. I nostri risultati sembrano quindi lasciare intravedere la possibilità di elaborare sistemi di validazione basati su di una serie di misurazioni fisiologiche. L'approccio mediante l'analisi delle componenti principali sembra offrire la possibilità di aggregare i parametri fisiologici in variabili associate con i differenti aspetti del benessere.

Dalle nostre elaborazioni abbiamo evidenziato discrepanze fra gli aspetti del benessere valutati attraverso i parametri ematici e le valutazioni effettuate con il modello SDIB di campo. Il nostro intento è stato quindi quello di ridefinire i pesi relativi, con cui riaggregare i punteggi dei vari indicatori previsti nel modello SDIB, al fine di ottenere un riordinamento degli allevamenti, utilizzando il punteggio ricalcolato con i nuovi pesi relativi, in sintonia con la valutazione effettuata sulla base dei parametri fisiologici. Per semplicità i nostri primi tentativi sono stati effettuate sulla base dei valori di cortisolo e dei parametri infettivo-infiammatori.

9.6 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Da queste elaborazioni abbiamo evidenziato che in entrambi i casi, sulla base del cortisolo o sui parametri infettivo-infiammatori, la nuova riaggregazione non ha comportato grosse variazioni nel peso relativo di molti indicatori. In entrambi i casi abbiamo osservato una riduzione del peso relativo del cluster alimentazione (forse perché relativamente omogeneo fra gli alimenti considerati) a favore del cluster allevamento nel caso del cortisolo ed a favore del cluster animale nel caso dei parametri infettivo-infiammatori. Una riduzione del peso relativo del cluster allevamento a favore del cluster animale era già stato suggerito in nostre precedenti ricerche (Dellabona, 2006). I risultati mostrano da un lato che con poche variazioni nei pesi relativi degli indicatori si riesce a riordinare gli allevamenti in sintonia con i risultati ottenuti con l'elaborazione dei parametri di validazione. Questa constatazione sembra indicare che i risultati del modello SDIB sono in parziale accordo con le valutazioni effettuate con i parametri fisiologici. Tuttavia emerge altresì che con i due approcci apparsi più efficaci, basati sul cortisolo o sui parametri infettivo-infiammatori applicati separatamente, si sono ottenuti risultati diversi. Sembra quindi necessario, ai fini della validazione del modello SDIB, continuare ad approfondire i rapporti da un lato fra i diversi indicatori fisiologici del benessere e dall'altro fra questi indicatori e le risultanze dei punteggi SDIB. In particolare, dalla nostra ricerca si evince che l'Analisi delle componenti principali può costituire un valido strumento per l'ottenimento di questo scopo, dunque in grado di validare le diverse componenti del benessere valutate con il modello SDIB alla luce degli indicatori "assoluti" del grado di benessere rappresentato da alcuni parametri ematici: il cortisolo e gli indici dello stato infiammatorio (proteine positive della fase acuta, tra cui si ricordano l'aptoglobina e la ceruloplasmina, e quelle negative, specialmente le albumine e il colesterolo).

10. CONCLUSIONI GENERALI

Il benessere animale è una tematica ormai consolidata da tempo, seppur molto dibattuta, specialmente a livello europeo sia per quanto riguarda l'attività scientifica e di ricerca sia dal punto di vista legislativo soprattutto per la crescente preoccupazione dell'opinione pubblica nei confronti di tale argomento. L'importanza dello sviluppo di uno strumento di valutazione del benessere è quindi reale, in quanto potrebbe fornire all'allevatore strumenti di scelta su cui basare possibili cambiamenti e miglioramenti della struttura aziendale e delle strategie produttive per agli animali, affinché questi possano esprimere al massimo le loro potenzialità produttive. Questo permetterebbe all'allevatore di adempiere alle imposizioni legislative, di fornirgli un grado sufficiente di informazioni su eventuali problemi di benessere e di metterlo in condizione di poter implementare un eventuale sistema di certificazione aziendale.

La valutazione oggettiva del benessere negli allevamenti di bovine da latte, risulta peraltro molto complessa e controversa. I principali problemi riguardano la scelta degli indicatori da utilizzare nel modello e l'aggregazione dei risultati ottenuti con ciascun indicatore in un punteggio globale che sia espressione del benessere reale. Alla luce di queste considerazioni, è evidente che un modello applicativo di valutazione del benessere necessita di una validazione scientifica. Anche da quest'ottica, le difficoltà sono numerose dal momento che non esiste un *gold standard* di riferimento rispetto al quale comparare il modello in quanto capace di stimare oggettivamente il benessere.

In funzione di quest'ultima osservazione, i tentativi di validazione messi a punto dalla nostra ricerca

si sono basati sullo studio di nuovi indicatori fisiologici che in associazione ad altri già consolidati ed a rilievi delle condizioni sanitarie (anche sub-cliniche) su tutti o gran parte degli animali di un certo allevamento, potranno essere di aiuto per la validazione dei modelli di valutazione–certificazione in campo del benessere di allevamento.

Tra i nuovi indicatori di tipo fisiologico si è preso anzitutto in esame la fruttosamina. Si tratta di una proteina glicata, derivante dal legame tra il glucosio e le proteine plasmatiche, che riflette la concentrazione media di glucosio nelle due-tre settimane che precedono il controllo. L'impiego di questo parametro potrebbe quindi fornire due chiavi di lettura: una, la valutazione retrospettiva del bilancio energetico puro e semplice, aspetto particolarmente importante nelle prime settimane di lattazione per il forte aumento produttivo. Una seconda chiave è invece connessa al fatto che la fase di transizione rappresenta il momento più critico del ciclo produttivo della bovina da latte ad alta produttività; in essa si verifica infatti la maggiore incidenza delle malattie pure in grado di aggravare il bilancio energetico negativo, ma l'origine è diversa.

I nostri risultati hanno mostrato che sono soprattutto i valori di fruttosamina riscontrati fra la 3^a e la 5^a settimana di lattazione quelli che maggiormente riflettono la glicemia media delle settimane precedenti, quindi l'entità del deficit energetico e della riduzione delle condizioni nutrizionali degli animali. Da essi emerge inoltre che il maggiore deficit energetico durante il puerperio non è tanto e soltanto conseguenza dell'elevata produzione, ma soprattutto frutto di una minore ingestione che può derivare dalla presenza di fenomeni infettivo-infiammatori. Se interessano l'animale durante la fase di transizione, si osservano valori talora più elevati di proteine positive di fase acuta nel parto, mentre la fruttosamina è più bassa e contemporaneamente si nota la riduzione delle proteine negative di fase acuta (specialmente le albumine), quindi dei valori di LAI (indice epatico basato su dette proteine controllate al primo mese di lattazione).

Tutte queste complesse relazioni lasciano presupporre che, attraverso il controllo della fruttosamina, effettuato fra 40 e 60 DIM, si possano indirettamente ottenere informazioni inerenti anche lo stato di salute e quindi di benessere degli animali nel puerperio. Sono tuttavia necessarie ulteriori ricerche per confermare l'utilità della fruttosamina per tali finalità. Questi studi potrebbero per esempio essere volti al confronto tra la fruttosamina ed i parametri che compongono il LAI (albumine, colesterolo e vitamina A).

Nella valutazione del benessere animale un altro aspetto fondamentale è rappresentato dall'individuazione di un eventuale status di stress cronico, ricorrendo ad esempio alla cortisolemia plasmatica. Tuttavia è necessario avere cautela nell'esecuzione dei prelievi e nell'interpretazione dei risultati dal momento che esistono alcuni fattori in grado di influenzare il livello basale di tale parametro (es. il prelievo od altre operazioni come possibile fonte di stress acuto).

Di grande importanza potrebbe essere anche valutare con altrettanta attenzione la risposta delle ghiandole surrenali al trattamento con corticotropina, in quanto influenzata dallo stress cronico. Tuttavia, i nostri risultati hanno evidenziato che, per una più accurata valutazione della risposta surrenalica, è opportuno usare bassi dosaggi di corticotropina per non saturare la capacità di legare il cortisolo da parte della transcortina plasmatica e rendere così in differenziabili gli animali in termini di reattività surrenalica. Tuttavia, i nostri risultati hanno pure evidenziato che i valori bassi di cortisolo, dopo il trattamento con corticotropina potrebbero indicare una bassa reattività della ghiandola surrenale, come atteso, ma anche una minore presenza di transcortina; pare inoltre, possibile ipotizzare che il calo di questa proteina carrier possa conseguire a fenomeni di tipo infiammatorio, soprattutto nel puerperio. E' quindi necessario controllare che, per una corretta interpretazione dei risultati della risposta surrenalica al trattamento con corticotropina, non siano in atto situazioni all'origine di un forte calo delle proteine negative di

fase acuta, fra le quali vi è il carrier del cortisolo, al fine di evitare di giudicare non stressati (cronicamente) animali che in realtà lo sono.

Per evitare questo tipo di equivoco, non potendo misurare la transcortina, sugli stessi animali, si può usare un doppio *challenge* in tempi successivi: prima con un basso dosaggio di corticotropina (per avere l'indicazione della risposta surrenalica) e poi con alto (per avere indicazione sul livello di transcortina).

Questi parametri fisiologici (cortisolo e fruttosamina) nuovi o diversamente eseguiti-interpretati rispetto al passato, unitamente ad una serie di parametri ematici che identificano la presenza di processi infiammatori (e le loro conseguenze) negli animali, sono stati utilizzati per un primo tentativo di validazione del modello SDIB. Ciò al fine di accertare se i suddetti parametri possano fungere da indicatori “assoluti” per ottenere indicazioni più oggettive delle reali condizioni di benessere/malessere degli animali allevati, costituendo pertanto un valido “riferimento” per i modelli di campo.

I primi risultati ottenuti hanno mostrato che, come era logico da attendersi, l'utilizzo di singoli parametri fisiologici può porre problemi di interpretazione, e fornire risultati molto variabili in chiave di benessere, anche in funzione del parametro fisiologico utilizzato. Viceversa, l'utilizzo contemporaneo di una serie di indicatori di tipo biochimico-fisiologico, potrebbe fornire indicazioni per una valutazione più completa dei diversi aspetti del benessere.

Il modello di elaborazione utilizzato è stato quello dell'analisi multivariata. Tra gli indicatori di tipo fisiologico che sono sembrati molto importanti per la validazione dei modelli di valutazione del benessere animale, troviamo i parametri relativi a fatti infettivo-infiammatori (proteine positive della fase acuta, tra cui si ricordano l'aptoglobina e la ceruloplasmina, e quelle negative, specialmente le albumine e il colesterolo). Essi sono già un indice di benessere/malessere, ma possono essere utili anche per interpretare più correttamente i risultati di altri parametri comunemente utilizzati per valutare lo stress (ad esempio quello cronico, attraverso la risposta della ghiandola surrenale al trattamento con corticotropina). Altri parametri fisiologici utilizzati come riferimento, e risultati molto importanti, sono il cortisolo e la fruttosamina.

I nostri risultati sembrano infine evidenziare che l'analisi multivariata dei dati può rappresentare un valido strumento per studiare, da un lato le complesse relazioni fra i singoli indicatori fisiologici utilizzati come riferimento e, dall'altro, i rapporti che si stabiliscono tra questi indicatori ed i dati di benessere evidenziati dai modelli di campo. Le informazioni prodotte con questo tipo di analisi possono fornire utili indicazioni sia in termini teorici di validazione del benessere (soprattutto per meglio precisare i vari aspetti che lo compongono e che confluiscono

nel benessere globale) e sia in termini applicativi di miglior ridefinizione dei pesi relativi con cui aggregare i diversi aspetti del benessere nel modello di campo.

In particolare, i risultati ottenuti con questo approccio multivariato, applicato ai parametri biochimico-fisiologici hanno mostrato un parziale accordo fra la valutazione del benessere ottenuta con il modello SDIB. Specie i parametri infettivo infiammatori e il cortisolo basale hanno fornito migliori informazioni per la ridefinizione dei pesi relativi con cui sono stati riaggregati i punteggi dei vari indicatori per l'ottenimento di uno score complessivo da ritenersi più prossimo alla realtà.

In ultima analisi, i risultati ottenuti sembrano quindi indicare che il modello SDIB ha una sua validità di fondo, confermata attraverso l'impiego di diversi indicatori di tipo fisiologico, ritenuti a rigor di logica il miglior termine di paragone (unitamente a quelli comportamentali) del reale stato di benessere.

APPENDICE

METODICHE ANALITICHE

Analisi degli alimenti

Umidità: corrisponde alla quantità di acqua persa da un campione lasciato in stufa a 65°C fino a peso costante. In pratica, è uguale alla differenza tra peso umido e peso secco del campione in esame.

Sostanza secca: con questo termine si intende la differenza fra 100 ed il precedente valore di umidità (espresso in percentuale). Tutti i campioni dopo l'essiccazione in stufa a 65°C sono stati macinati con mulino a coltelli dotato di griglia di 1 mm, prima delle successive determinazioni.

Proteine gregge: sono determinate con il metodo Kjeldahl. È un metodo basato sulla trasformazione dell'azoto (N) organico in N ammoniacale. Un campione rappresentativo del prodotto in analisi è mineralizzato con acido fosforico. Dopo l'aggiunta nella soluzione mineralizzata di una quantità prefissata di idrossido di sodio, si procede con la distillazione in corrente di vapore. L'ammoniaca (NH₃), trasportata dalla corrente di vapore, è fatta condensare in un beaker, dove è bloccata per mezzo di una soluzione acquosa di acido bórico (H₃BO₃) satura. L'ultima fase della metodica prevede una titolazione con un acido forte (H₂SO₄) con la quale è possibile risalire alla quantità di N presente nel campione.

Lipidi grezzi: si basa sulla estrazione dei grassi con solvente apolare (etere di petrolio). Per effettuare l'estrazione con solvente si utilizza l'apparecchiatura Soxhlet. La massa di campione in analisi, varia in funzione del contenuto in grassi atteso. Nel caso dei concentrati si pesano circa 3 g di campione in ditali di cartoncino poroso, che restano immersi per 50 minuti in etere. I ditali sono quindi sollevati e mantenuti sospesi e dilavati dall'etere, in flusso continuo, per altri 50 minuti. In seguito i lipidi vengono separati dall'etere per evaporazione. Le coppette sono quindi poste in stufa a 105°C per 30 minuti e poi pesate. Per differenza con la tara, si ottiene il contenuto in grasso dei 3 g iniziali di campione. Per l'estrazione totale occorre procedere prima con l'idrolisi acida dei campioni. Questa è generalmente eseguita per l'analisi di campioni contenenti acidi grassi "protetti".

Fibra grezza: metodo Weende. La tecnica prevede il trattamento di 1 g di campione posto in crogiolo su apparecchio Fibertec Tecator con una soluzione bollente di acido solforico (0,26 M) per 30 minuti: dopo tale periodo si rimuove l'acido e quindi si ripete l'attacco con una soluzione di idrossido di sodio (0,31 N), anch'essa mantenuta in ebollizione per 30

minuti. Alla fine dei due trattamenti è effettuato un risciacquo con acqua demineralizzata calda e per ultimo la disidratazione con acetone. Il residuo è messo in stufa a 105°C per una notte e pesato alla sua uscita, dopo di che è incenerito in muffola a 500°C per 3 ore e pesato una seconda volta. La differenza tra le due ultime pesate, espressa in percentuale, è definita come contenuto di fibra grezza.

Ceneri: il campione è posto in muffola alla temperatura di 550°C fino a peso costante, se ne pesa quindi il residuo.

Fibra Neutro Detersa (NDF): è eseguita con apparecchio Fibertec Tecator. In un crogiolo sormontato da tubo di refrigerazione si pone 1 g di materiale e si aggiungono 100 mL di una soluzione neutro detergente, costituita da sodio laurilsolfato (30,00 g), EDTA (18,61 g), sodio borato decaidrato (6,81 g), fosfato bisodico anidro (4,56 g), glicole etilenico monoetere (10,00 mL) e acqua distillata (1000,00 mL).

Si fa bollire per 60 minuti, quindi si filtra, si risciacqua più volte con acqua demineralizzata e si disidrata con acetone. Il crogiolo col residuo è posto in stufa a 105°C per 8 ore, pesato e successivamente incenerito in muffola a 500°C per 3 ore. Si ripesa e la differenza tra le due pesate, espressa in termini percentuali, esprime il contenuto in NDF.

Zuccheri totali: per tale analisi si utilizzano: soluzione di fenolo al 5 % (soluzione stabile a temperatura di 2-5°C per 20 giorni), acido solforico concentrato (H₂SO₄) 96 % e glucosio puro in polvere necessario ad ottenere la curva di calibrazione. Il principio dell'analisi è rappresentato dalla capacità degli zuccheri di reagire con gli acidi forti per dare dei furfurali, caratterizzati dalla presenza di un gruppo aldeidico. La presenza del gruppo aldeidico permette la reazione tra i furfurali ed il gruppo OH del fenolo, reazione che porta alla formazione di un composto colorato che assorbe nel visibile ed è quindi misurabile allo spettrofotometro (505 nm).

La curva di calibrazione è costruita con le assorbanze lette analizzando cinque soluzioni di glucosio, aventi le seguenti percentuali: 0,0128 %, 0,024 %, 0,050 %, 0,075 % e 0,100 %.

Amido: La determinazione si basa su una separazione dai campione degli zuccheri semplici per mezzo di tre lavaggi in etanolo all'80 %. Utilizzando l'enzima α -amilasi l'amido è trasformato in maltosio e successivamente in glucosio attraverso l'amiloglucosidasi. Il glucosio è poi determinato con autoanalizzatore; la procedura seguita per l'analisi è identica a quella per la determinazione dello stesso parametro nel sangue ed è descritta dettagliatamente di seguito.

pH: mediante pH-metro ad elettrodo in vetro combinato, tale misura è effettuata generalmente per i foraggi insilati. Si procede immettendo direttamente nel prodotto macinato, diluito ed omogeneizzato, l'elettrodo.

Azoto ammoniacale (N-NH₃): Analisi effettuata mediante distillazione. In particolare si pesano 10 g di prodotto macinato e si fanno bollire in 300 - 400 mL di acqua bidistillata alla presenza di MgO. L'NH₃ distillata è raccolta in acido borico (soluzione satura al 4 %) ed è successivamente titolata con acido solforico 1 N.

Analisi del latte

Sui campioni di latte si sono effettuate analisi per valutare le sue caratteristiche qualitative, ovvero il contenuto in grasso, proteine e lattosio; e lo stato sanitario della mammella mediante la determinazione del numero di cellule somatiche. La determinazione del contenuto in grasso si esegue utilizzando lo strumento MilkoScanTM FT 120 flow system (Type 71200) della FOSS Electric A/S DK, il cui principio di funzionamento si basa sulla riflettanza dei raggi infrarossi (IR). Lo spostamento dei raggi IR avviene con un rapido movimento di un sistema a specchi identificato come “interferometro FTIR”. Lo strumento è calibrato utilizzando dei campioni a tenore noto di grasso, proteine e lattosio, le cui misurazione si effettua con metodi di riferimento. In particolare: l'analisi del grasso è basata sul metodo Gerber.

La determinazione delle proteine avviene utilizzando il metodo Kjeldahl (il cui principio è stato illustrato nelle metodiche di analisi degli alimenti), mentre il lattosio si misura col metodo polarimetrico. L'analisi delle cellule somatiche (n/mL) è stata eseguita utilizzando l'apparecchiatura Fossomatic 180.

Analisi chimica del sangue

Ad eccezione della determinazione dell'ematocrito, effettuata subito dopo il prelievo su una piccola aliquota di sangue in toto, utilizzando un'apposita centrifuga (ALC 4203, Cologno Monzese, Italia), la maggior parte delle analisi ematiche è stata effettuata su plasma utilizzando un analizzatore automatico (ILAB 600 della Instrumentation Laboratory, MA, USA). Il principio delle diverse metodiche è di seguito riportato:

Ematocrito [L/L]: ottenuto per valutazione del volume occupato dagli eritrociti sul volume totale dopo centrifugazione del sangue in microcapillari.

Glucosio [mmol/L]: kit IL (Instrumental Laboratory) determinazione enzimatica con ossidasi [Glucosio Ossidasi (GOD) e Perossidasi (POD)]. L'azione della glucosio ossidasi, catalizza l'ossidazione del glucosio ad acido gluconico e H₂O₂. La perossidasi catalizza la reazione di due

molecole di H_2O_2 con una di fenolo ed una di 4-aminoantipirina a chinoneimina (colorante rosso) e 4 molecole di H_2O . La formazione del colorante ed il conseguente aumento di assorbanza registrato a 510 nm è proporzionale alla concentrazione di glucosio presente nel campione. La metodica prevede l'impiego di 9 μL di plasma cui vengono aggiunti 150 μL di reattivo (GOD, POD, 4-aminoantipirina, fenolo) e 75 μL di H_2O e dopo 50 secondi si effettuano le letture a 510 e 600 nm (quest'ultima lettura è paragonabile al bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata alla concentrazione di glucosio. Lo strumento è calibrato mediante l'impiego di un pool di plasma bovino a tenore noto di glucosio.

Acidi grassi non esterificati (NEFA) [mmol/L]: kit della WAKO enzimatico-colorimetrico. Dalla reazione, catalizzata dalla Acil-CoA sintetasi (ACS), tra acidi grassi non esterificati del plasma e CoenzimaA (CoA), in presenza di adenosin trifosfato (ATP) e ioni magnesio, si liberano adenosin monofosfato, pirofosfato e Acil-CoA. Questo è in seguito ossidato dall'acil-CoA ossidasi (ACOD) con liberazione di acqua ossigenata, la quale, in presenza di una perossidasi (POD), favorisce la condensazione tra la 3-metil-N-etil-N-(β -idrossietil)-anilina (MEHA) e la 4-aminoantipirina per formare un complesso colorato con massimo di assorbanza a 546 nm.

La metodica prevede l'impiego di 4 μL di plasma a cui vengono aggiunti subito 75 μL di reattivo 1 (soluzione tampone a pH 6,9 contenente ACS, CoA, ATP, 4-aminoantipirina) e 5 μL di H_2O a 300 secondi 20 μL di H_2O e a 720 secondi il reattivo 2 (MEHA, ACOD, POD) e 5 μL di H_2O . Dopo 1270 secondi dall'inizio dell'analisi si effettua la lettura a 546 nm che, depurata del valore del bianco reagente, è linearmente correlata alla concentrazione dei NEFA. La calibrazione dello strumento è effettuata mediante standard di potassio oleato con concentrazione pari ad 1 mmol/L.

β -idrossibutirrato (β OHB) [mmol/L]: Kit Randox (cinetico enzimatico) L'enzima idrossibutirrato-deidrogenasi (HBDH) catalizza l'ossidazione del β -idrossi butirrato ad aceto acetato. La conseguente riduzione del NAD a NADH comporta un aumento dell'assorbanza a 340 nm. Il metodo impiega 7 μL di plasma cui vengono aggiunti 280 μL di reattivo 1 (Tampone Tris-buffer, acido ossalico, NAD⁺, 3-HBDH) e 10 μL di H_2O . Vengono effettuate 2 letture a 340 nm, rispettivamente 118,2 secondi e 243,6 secondi dopo l'aggiunta del reattivo. In relazione alla variazione di assorbanza ed in base alla curva di taratura dello strumento è calcolata la concentrazione. La calibrazione è effettuata mediante standard, a concentrazione nota contenuto nel Kit.

Colesterolo totale [mmol/L]: kit IL (enzimatico-colorimetrico). La metodica si basa sulla scissione degli esteri del colesterolo presenti nel plasma in colesterolo ed acidi grassi per effetto della colesterolo esterasi (CHOE). Dalla reazione, catalizzata dalla colesterolo ossidasi (CHOD)

tra il colesterolo libero e l'ossigeno dell'aria si formano colest-4-en-3-one e acqua ossigenata. L'acqua ossigenata, in una reazione catalizzata dalla perossidasi (POD), reagisce con la 4-amminoantipirina (4-AAP) ed il fenolo per dare acqua e chinoneimina, composto colorato rilevabile a 510 nm. Il metodo impiega 5 μL di plasma cui vengono aggiunti 100 μL di reattivo (4-AAP, fenolo, POD, CHOD, CHOE) e 150 μL di H_2O e dopo 490 secondi si effettuano le letture a 510 e 570 nm (la seconda serve come bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata con la concentrazione e la calibrazione è effettuata mediante pool di plasma a valore noto.

Vitamina A ($\mu\text{g}/100\text{mL}$), Vitamina E ($\mu\text{g}/\text{mL}$) e β -carotene ($\text{mg}/100\text{mL}$): si procede all'estrazione delle vitamine da 0,5 ml di plasma a cui sono aggiunti 0,5 di etanolo assoluto e, dopo agitazione al vortex, 5 ml di n-esano (per HPLC). Si agita nuovamente e si pone la soluzione in agitatore oscillante per 10 minuti. Dopo l'agitazione le provette sono centrifugate alla temperatura di 10 °C e 3520 g per 5 minuti. Si prelevano quindi 4 ml di surnatante e si portano a secco in corrente di azoto mantenendo le provette in bagno termostatico a 37 °C e al riparo dalla luce. Si riprende il tutto con 0,4 ml di soluzione metanolo (80%) e THF (20%), si agitano al vortex e si centrifugano per 5 minuti. A questo punto si procede all'iniezione del surnatante in HPLC: si utilizza una colonna ALLOSPHERE ODS- 2 3 micron, 150 mm x 4,6 mm e la soluzione metanolo (80%) – THF (20%) ad un flusso di 1 ml/min come fase mobile. Il tempo di eluizione per la Vitamina A è di 2,05 minuti; per la vitamina E è di 2,90 minuti; il β – carotene invece viene fluito dopo 5 minuti. Le lunghezze d'onda impiegate sono 325 nm per la vitamina A, 290 nm per la vitamina E e 460 per il β – carotene. Per il calcolo del risultato è stata utilizzata una retta di regressione di 4 punti (A, B, C, D), con le seguenti concentrazioni:

- 1) punto A: 200 $\mu\text{g}/\text{l}$ vitamina A; 625 $\mu\text{g}/\text{l}$ vitamina E e β – carotene;
- 2) punto B: 400 $\mu\text{g}/\text{l}$ vitamina A; 1250 $\mu\text{g}/\text{l}$ vitamina E e β – carotene;
- 3) punto C: 600 $\mu\text{g}/\text{l}$ vitamina A; 2500 $\mu\text{g}/\text{l}$ vitamina E e β – carotene;
- 4) punto D: 800 $\mu\text{g}/\text{l}$ vitamina A; 5000 $\mu\text{g}/\text{l}$ vitamina E e β – carotene.

Urea [mmol/L]: kit IL a determinazione enzimatica mediante ureasi e glutammato-deidrogenasi (GLDH). L'ammoniaca originata dall'idrolisi dell'urea per azione dell'ureasi è utilizzata dalla GLDH nella conversione dell' α -osso-glutarato a L-glutammato. In tale reazione, la quantità di NADH ossidata, misurata in termini di riduzione di assorbanza a 340 nm, è proporzionale alla concentrazione di urea.

L'analisi prevede l'utilizzo 8 μL di plasma cui vengono aggiunti 270 μL di reattivo (α -osso-glutarato, ADP, ureasi, GLDH, NADH) e 30 μL di acqua e dopo un'attesa di 45 secondi vengono effettuate due letture a 340 nm ad un intervallo di 70 secondi l'una dall'altra. La differenza fra le

due letture è linearmente correlata alla concentrazione di urea e la calibrazione è effettuata mediante pool di plasma a tenore noto.

Creatinina [$\mu\text{mol/L}$]: kit IL (colorimetrico). Il metodo è basato sulla reazione fra acido picrico e la creatinina in ambiente alcalino. La quantità di complesso colorato formato, con massimo di assorbimento a 510 nm, è in relazione alla concentrazione di creatinina.

La metodica impiega 12 μL di plasma cui vengono aggiunti 90 μL di reattivo 1 (idrossido di sodio) e dopo 300 secondi 90 μL di reattivo 2 (acido picrico). A 330 e 400 secondi si effettuano 2 letture a 510 e 570 nm (la seconda come bianco campione). La differenza tra le letture è linearmente correlata alla concentrazione di creatinina e la calibrazione si effettua mediante standard a valore noto.

Calcio [mmol/L]: kit IL. Il metodo, di tipo colorimetrico, si basa sulla formazione di un complesso colorato derivante dalla reazione in ambiente alcalino fra calcio e cresoftaleina complessone. L'intensità del colore prodotto è proporzionale alla quantità di calcio presente nel campione. Le interferenze da magnesio sono prevenute dalla capacità complessante selettiva della 8-ossichinolina.

La metodica impiega 9 μL di plasma cui vengono aggiunti 180 μL di reattivo 1 (2-amino-2-metil-1-propanolo) e dopo 300 secondi 180 μL di reattivo 2 (orto-cresoftaleina complessone e 8-idrossi chinolina). 20 secondi prima e 100 secondi dopo rispetto all'aggiunta del reattivo 2 vengono effettuate le letture a 570 e 670 nm (quest'ultima serve come bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata alla concentrazione di calcio. La calibrazione dello strumento è effettuata mediante pool di plasma a valore noto.

Fosforo inorganico [mmol/L]: kit IL. Il metodo, di tipo colorimetrico, si basa sulla reazione in ambiente acido tra il fosforo inorganico e l'ammonio molibdato senza deproteinizzazione. Dalla reazione si forma il complesso fosfomolibdato non ridotto in quantità proporzionali alla concentrazione di fosforo inorganico. La quantità del complesso formatosi è determinata misurando l'assorbanza a 340 e 375 nm.

L'analisi è effettuata impiegando 6 μL di plasma cui vengono aggiunti 150 μL di reattivo 1 (acido solforico) e 20 μL di H_2O . Dopo 300 secondi vengono aggiunti 150 μL di reattivo 2 (molibdato di ammonio) e 20 μL di H_2O . Le letture a 340 e 380 nm (la seconda lettura è usata come bianco campione) vengono effettuate 360 secondi dopo l'aggiunta del reattivo 2. La differenza fra le letture è linearmente correlata con il livello di fosforo. Per la calibrazione è utilizzato un pool di plasma a tenore noto.

Magnesio [mmol/L]: kit IL. Il metodo si basa sulla formazione di un complesso colorato (rosa) come prodotto della reazione tra magnesio e calmagite in soluzione alcalina. L'intensità della colorazione è direttamente proporzionale alla concentrazione di magnesio.

Il metodo prevede l'impiego di 12 µL di plasma cui vengono aggiunti 280 µL di reattivo (calmagite, idrossido di potassio) e 40 µL di H₂O. Dopo 100 secondi sono effettuate le letture a 510 e 700 nm (quest'ultima come bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata con la concentrazione di magnesio. La calibrazione è effettuata con pool di plasma a valore noto.

Sodio, Potassio e Cloro [mmol/L]: determinazione potenziometrica mediante elettrodi specifici. Per il sodio è impiegato un elettrodo in vetro, per il potassio un elettrodo a membrana e per il cloro un elettrodo con parte sensibile in argento. Tutti gli elettrodi sono combinati con uno di riferimento. La calibrazione dello strumento è effettuata mediante due standard a valore noto (alto e basso) costruendo una retta di riferimento per il calcolo delle concentrazioni dei campioni in analisi.

Zinco [µmol/L]: kit WAKO (colorimetrico) mediante reattivo cromogeno con formazione di un chelato rosso. La metodica prevede la deproteinizzazione del campione con acido tricloroacetico. Dalla nostra esperienza di laboratorio, è emerso che, procedendo all'analisi su plasma senza deproteinizzazione si ottengono risultati ugualmente accettabili. Questo probabilmente grazie all'autoanalizzatore che ci consente di fare una lettura a due lunghezze d'onda e ciò consente l'eliminazione di una parte delle interferenze, causate dalla diversa colorazione della matrice.

La metodica impiega 30 µL di plasma cui vengono aggiunti 150 µL di reattivo cromogeno e 30 µL di H₂O. Dopo 330 secondi si effettuano le letture a 546 e 660 nm (quest'ultima equiparabile al bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata alla concentrazione di zinco e la calibrazione si effettua mediante pool a valore noto.

Ceruloplasmina [µmol/L]: si basa sulla colorazione che trae origine dall'ossidazione dell'orto-parafenilendiammina, operata dalla ceruloplasmina.

La metodica impiega 25 µL di plasma cui vengono aggiunti 140 µL di tampone acetato (0,8 M, pH 6,4 addizionato estemporaneamente con parafenilendiammina allo 0,14 %) e 40 µL di H₂O. Dopo 350 secondi si effettuano le letture a 546 e 660 nm (la seconda funge da bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata con la concentrazione di ceruloplasmina e la calibrazione è effettuata mediante pool a valore noto. Il valore del pool è stato determinato dosando il rame nel campione e conoscendo che circa il 90 % del rame plasmatico è contenuto nella ceruloplasmina, dove per ogni molecola di ceruloplasmina ci sono 6 atomi di rame,

sapendo inoltre che il peso molecolare della ceruloplasmina è di 124000 D si risale, dal tenore in rame, al corrispondente valore in ceruloplasmina.

Aptoglobina [g/L]: La determinazione si effettua mediante un test colorimetrico.

Per l'analisi si impiegano 12 μL di plasma cui si aggiungono 60 μL di reattivo 1 (metaemoglobina, soluzione fisiologica, H_2O bidistillata) e 5 μL di H_2O . A 300 secondi si aggiungono 170 μL di reattivo 2 (Guaiacol, H_2O_2) e 5 μL di H_2O . A 10 secondi dall'aggiunta del reattivo 2 lo strumento esegue una prima lettura (la reazione colorimetrica non è ancora avvenuta perciò questo valore corrisponde al bianco campione) ed una seconda lettura è effettuata dopo 250 secondi a reazione colorimetrica avvenuta. La variazione di assorbanza a 450 nm è proporzionale alla concentrazione di aptoglobina presente nel campione.

Proteine totali [g/L]: kit IL. La metodica, di tipo colorimetrico, si basa sulla reazione in soluzione fortemente alcalina tra polipeptidi che contengono almeno due legami peptidici con il solfato di rame nel reagente biureto. Il prodotto della reazione è un complesso stabile di colore lavanda che assorbe luce intorno a 550 nm.

L'analisi utilizza 6 μL di plasma cui vengono aggiunti 200 μL di reattivo (idrossido di sodio, ioduro di potassio, solfato di rame, EDTA) e dopo 190 secondi si effettuano le letture a 546 e 700 nm (la seconda serve come bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata alla concentrazione in proteine e, per la calibrazione, si fa riferimento ad un pool a valore noto.

Albumine [g/L]: la determinazione delle albumine è eseguita sfruttando la variazione di colore dovuta alla formazione di un complesso fra le albumine e il verde di bromocresolo (kit IL).

Per l'analisi si impiegano 5 μL di plasma cui vengono aggiunti 230 μL di reattivo [soluzione di verde bromocresolo e acido succinico (pH 3,8)] e dopo 45 secondi si effettuano le letture a 600 e 700 nm (la seconda come bianco campione). La differenza fra le letture è linearmente correlata con la concentrazione di albumine e la calibrazione è effettuata mediante un pool a valore noto.

Globuline [g/L]: le globuline non sono il risultato di un'analisi ma il risultato di un calcolo. Il valore si ottiene detraendo alle proteine totali il valore in albumine.

Paraoxonasi (PON) [U/mL]: la metodica è di tipo cinetico-fotometrico e si basa sulla misura dell'idrolisi del paraoxon da parte della arildialchil-fosfatasi chiamata anche paraoxonasi, con formazione del p-nitrofenolo. La metodica procede come segue: si pipettano 8 μL di campione a cui si aggiungono 125 μL di soluzione substrato (formato da 1 mmol/L di paraoxon e 1 mmol/L di CaCl_2 in una soluzione tampone di glicina 0,05 mmol/L) e 125 μL di acqua ultrafiltrata; la lettura, avviene a 420 nm, essa viene effettuata a 17 (bianco) e 51 secondi (lettura finale). Si misura la differenza di assorbanza tra le 2 letture. Si utilizzano, per la correzione dei risultati, 3

standard a valore noto: Precinorm (Roche, Germania), Randox (Randox Laboratories LTD, UK) e pool di plasma bovino.

Aspartato-amino-transferasi (GOT/AST) [U/L]: La determinazione si basa sulla trasformazione del L-aspartato in ossalacetato ed L-glutammato ad opera della GOT/AST e sulla successiva formazione di L-malato a partire dall'ossalacetato, operata dall'aggiunta di malato deidrogenasi e NADH. La diminuzione di assorbanza dovuta all'ossidazione di NADH a NAD⁺ letta a 340 nm è direttamente proporzionale alla concentrazione di GOT/AST nel campione.

Operativamente, il campione (14 µL di plasma) è incubato a 37°C con substrato tamponato (145 µL, pH 7,4) contenente L-aspartato, NADH, MDH, LDH (reattivo 1). Dopo un'incubazione di 5,1 minuti, sono addizionati 35 µL di una soluzione a base di 2-ossoglutarato (reattivo 2). A 45 e 170 secondi dall'aggiunta del reattivo 2 vengono effettuate le due letture a 340 nm. In base ai valori ottenuti lo strumento calcola la regressione ed esprime la variazione di assorbanza per minuto. Tale valore è poi moltiplicato per il fattore ottenendo così la concentrazione dell'enzima in U/L. Il fattore è così calcolato:

$$\text{Fattore} = (V_r/V_s) \cdot (1/E) \cdot (1/Pl) \cdot 10^6$$

dove:

V_r = volume totale (mL)

V_s = volume campione (mL)

E = assorbanza molare del NAD (costante pari a $6,3 \cdot 10^3$)

Pl = lunghezza della cella in cm

10^6 = conversione in U/L

I risultati dell'analisi vengono controllati mediante standard a valore noto.

γ -glutamyl-transferasi (GGT) [U/L]: kit IL (enzimatico). La determinazione analitica segue le norme della I.F.C.C (International Federation of Clinical Chemistry) e si basa sulla reazione, catalizzata dalla γ -glutamyl-transferasi, tra L- γ -glutamyl-3-carbossi-4-nitroanilide e glicilglicina. Il 5-amino-2-nitrobenzoato, prodotto colorato della reazione, determina una variazione di colore letta a 405 nm. La velocità con la quale aumenta l'intensità di colorazione è proporzionale alla quantità di γ -glutamyl-transferasi presente nel plasma.

L'analisi impiega 18 µL di campione cui vengono aggiunti 145 µL di reattivo (idrossido di sodio, glicilglicina, L- γ -glutamyl-3-carbossi-4-nitroanilide) e 35 µL di H₂O. A 20 e 170 secondi dall'aggiunta del reattivo vengono effettuate 2 letture a 405 nm. Lo strumento ricava la regressione e calcola la variazione di assorbanza per minuto che, moltiplicata per il fattore, restituisce la concentrazione in U/l. Il fattore si calcola come per la AST/GOT in cui il valore di

E (costante) della γ -glutamyl 3-carbossi-4-nitroanilide è pari a $9,5 \cdot 10^3$. Anche in questo caso si impiegano controlli di qualità a tenore noti di enzima.

Bilirubina totale [$\mu\text{mol/L}$]: kit IL determinazione colorimetrica con diazotazione. La bilirubina totale presente nel campione è direttamente proporzionale alla quantità di azobilirubina che si forma in seguito alla reazione, in presenza di litio dodecilsolfato, tra la stessa bilirubina totale e l'acido sulfanilico diazotato. Per l'analisi si impiegano 40 μL di plasma cui vengono aggiunti subito 105 μL di reattivo 1 (Litio dodecilsolfato) e 35 μL di H_2O e dopo 300 secondi 75 μL di reattivo 2 (Acido Cloridrico e Acido Sulfanilico). 20 secondi prima e 220 secondi dopo rispetto all'aggiunta del reattivo 2 si effettuano le letture a 546 nm. La differenza fra le letture è linearmente correlata alla concentrazione di bilirubina e la calibrazione è effettuata utilizzando standard a valore noto.

Fosfatasi alcalina (ALP) [U/L]: kit IL (enzimatico) al nitrofenolo. La fosfatasi alcalina catalizza la defosforilazione del p-nitrofenilfosfato (pNPP) in p-nitrofenolo che assorbe luce a 405 nm. Questa reazione è perfezionata con l'utilizzo di 2-amino-2-metil-1-propanolo (AMP) e ioni metallo (Mg^{2+} , Zn^{2+}). L'analisi è effettuata impiegando 6 μL di plasma a 170 μL di reattivo (pNPP, AMP, Mg^{2+} , Zn^{2+}) e 30 μL di H_2O . A 45 e 190 secondi si effettuano 2 letture a 405 nm. Moltiplicando la variazione di assorbanza per minuto per il fattore si ottiene il valore in U/L. Il fattore è pari a $18,43 \cdot 10^3$ per cuvette dello spessore di 1 cm.

Acido sialico (mg/ml): kit Roche. Il metodo di tipo colorimetrico si basa sulla idrolisi dell'acido sialico ad opera di una neuraminidasi, con formazione di acido N-acetilneuroaminico libero (NANA) in presenza dell'enzima NANA-aldolasi viene scisso in N-acetilmannosamina e piruvato. In presenza di flavin-adenin-dinucleotide (FAD), e tiamina pirofosfato (TPP), il piruvato viene ossidato dalla piruvato ossidasi ad acetilfosfato, CO_2 e H_2O_2 formatasi è equivalente alla quantità di acido N-acetilneuroaminico libero. In presenza di 4-aminoantipirina, N-etil-N-2-idrossietil-3-toluidina, l' H_2O_2 viene convertita in un colorante rosso. L'analisi viene effettuata impiegando 3 μL di plasma a cui vengono aggiunti 150 μL di reattivo (costituito da soluzione rapporto 1:1 di due reagenti composti rispettivamente da neuroaminidasi e 4-aminoantipirina, e da NANA-aldolasi, piruvato ossidasi, per ossidasi, FAD, e TPP) e 40 μL di acqua ultrafiltrata in 2 riprese: la prima 302,3 secondi dopo l'aggiunta del primo reattivo, la seconda 426,9 secondi dopo l'aggiunta dei primi 20 μL di acqua. Dopo un'incubazione di 302,3 secondi vengono aggiunti 75 μL di stabilizzatore composto da soluzione tampone fosfato con un detergente e dopo 13 secondi viene effettuata la lettura a 546 nm. Per la calibrazione viene utilizzato un siero standard a tenore noto, incluso nel Kit. La concentrazione di acido sialico nel campione di plasma viene calcolata come segue:

$$C = (As/Ast) * Cst$$

C = concentrazione di acido sialico nel campione

As = assorbanza nel campione

Ast = assorbanza standard

Cst = concentrazione del siero standard.

Gruppi tiolici (SHp) [$\mu\text{mol/L}$]: kit Diacron (colorimetrico). Il principio del test si basa sulla formazione di un complesso colorato, come prodotto della reazione tra gruppi sulfidrilici e acido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) in un'apposita soluzione tampone (pH 7,6). L'intensità del colore rilevato strumentalmente è direttamente proporzionale alla concentrazione dei gruppi tiolici.

Il metodo prevede l'impiego di 10 μL di plasma cui vengono aggiunti 205 μL di reattivo (DTNB e soluzione tampone in rapporto 1:50). Dopo 315 secondi vengono effettuate le letture a 405 e 600 nm. La differenza tra le letture è correlata con la concentrazione dei gruppi tiolici.

La calibrazione viene effettuata con una soluzione di cisteina a titolo noto. I controlli di qualità vengono effettuati sulla soluzione di cisteina a titolo noto e su di un siero di controllo di origine umana liofilizzato (Control Serum ROMs della Diacron, Grosseto).

Metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROM) totali [$\text{mg H}_2\text{O}_2/100 \text{ mL}$]: I metaboliti reattivi dell'ossigeno vengono determinati mediante kit colorimetrico (Diacron, Grosseto). I ROM sono una varietà di radicali liberi caratterizzati da estrema reattività chimica che formano, nel plasma e nelle cellule, dei derivati altrettanto reattivi. Il principio della determinazione dei ROM totali consiste nella misura spettrofotometrica a 510 nm di un complesso colorato che si forma in seguito alla reazione di questi derivati con un cromogeno opportunamente tamponato. Per l'analisi vengono utilizzati 6 μL di plasma e 150 μL di reattivo. Il reattivo è costituito dalla miscela del tampone e del cromogeno in rapporto 100:1. La reazione dura 3 min e segue un procedimento cinetico, per cui è misurata la variazione di assorbanza per min ($\Delta A/\text{min}$). Le concentrazioni si ottengono moltiplicando le $\Delta A/\text{min}$, relative a ciascun campione di plasma, per il valore del fattore calcolato utilizzando uno standard a concentrazione nota (22,5 mg $\text{H}_2\text{O}_2/100 \text{ mL}$) di ROM totali. L'analisi è eseguita utilizzando la macchina autoanalizzatrice ILab 600 (Instrumentation Laboratory).

Metaboliti totali dell'Ossido Nitrico (NO_x), Nitriti (NO_2^-) e Nitrati (NO_3^-) [$\mu\text{mol/L}$]: La concentrazione di ossido nitrico può essere stimata come somma dei nitriti (NO_2^-) e dei nitrati (NO_3^-). La determinazione consiste essenzialmente di due fasi: riduzione enzimatica degli NO_3^- a NO_2^- (manuale) e determinazione degli NO_2^- (automatica). La riduzione enzimatica è una

reazione End-Point della durata di circa tre ore a bagnomaria alla temperatura di 37°C tra una soluzione riducente ed il campione in esame, in rapporto 3 a 1. In particolare, nel nostro caso sono stati utilizzati 187,5 mL di soluzione riducente e 62,5 mL di campione. La soluzione riducente ha la seguente composizione:

- 100 µL di tampone fosfato pH 7,5, 0,14M;
- 75 µL di H₂O bidistillata;
- µL di FAD, 100µM;
- 2 µL di NADPH, 12,5mM;
- µL di Nitrato Riduttasi, 3,5 U/mL.

In seguito alla riduzione enzimatica si procede con la determinazione degli NO₂⁻ totali (NO₂⁻ + NO₃) corrispondenti agli NO_x. La determinazione è di tipo colorimetrica (Test di Griess). Il principio della determinazione consiste nella misura spettrofotometrica a 546 nm di un complesso colorato derivante dalla reazione tra NO₂⁻ ed un cromogeno (naftil-etilen-diamina) opportunamente tamponato. Per l'analisi vengono utilizzati 40 µL di plasma e 160 µL di reattivo. Il reattivo è costituito dalla miscela del tampone e del cromogeno in rapporto 1 a 1. La reazione ha una durata di tre minuti al termine dei quali si procede alla lettura spettrofotometrica. I valori di assorbanza letti sono proporzionali alla concentrazione di NO₂⁻ e fanno riferimento ad una curva di calibrazione costruita utilizzando uno standard a concentrazione nota (20 µmol/L) di NO₂. La determinazione degli NO₂⁻ totali è realizzata utilizzando la macchina autoanalizzatrice ILAB 600 (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA). Per la determinazione dei soli NO₂, si procede direttamente alla analisi automatica, senza effettuare la riduzione enzimatica preliminare. Si procede in modo analogo alla determinazione precedente, con una sola differenza consistente nella calibrazione. Infatti, questa è effettuata sempre con un solo standard, ma ad una concentrazione di NO₂ minore rispetto al precedente (10 µmol/L). La quantificazione degli NO₃ è effettuata per differenza tra NO_x ed NO₂.

Fruttosamina [µg/mL]: La determinazione della fruttosamina è basata su un metodo colorimetrico ,mediante l'utilizzo di un kit colorimetrico della Randox. Il principio della metodica è di seguito riportato: a pH alcalino, il glucosio legato ai gruppi aminici delle proteine con legame chetoaminico stabile (fruttosamina) riduce il blu di nitrotetrazolio. Si forma un complesso colorato la cui intensità di colore è proporzionale al grado di glicazione della proteina e quindi alla concentrazione della fruttosamina presente nel campione.

La proteinasi K digerisce la proteina glicata per produrre frammenti di proteina glicata. La ketoamina ossidasi (KAO) ossida il legame ketoaminico dei frammenti delle proteine glicate, come risultato di questa reazione vengono rilasciati sia aminoacidi che acqua ossigenata e tali

prodotti sono coinvolti in una reazione colorimetrica. La quantità di colore sviluppata a 550 nm è proporzionale alla concentrazione di proteina glicata presente nel campione.

Cortisolo (ng/ml): la concentrazione del cortisolo totale nel plasma bovino è determinata con metodo radioimmunologico diretto, impiegando un kit commerciale (Diagnostic Products Corporation) per la determinazione quantitativa nel siero/plasma umano.

Il cortisolo, marcato con 125I, compete per i siti anticorpali con il cortisolo del campione o degli standards (25/50 ml) durante un certo tempo di incubazione (45-60 minuti a 37°C). Tuttavia agenti bloccanti, che servono a liberare il cortisolo dalle proteine “carrier” devono essere presenti nella miscela di reazione ed aggiunti insieme al cortisolo marcato con 125I (1000 ml). Poiché l’anticorpo è immobilizzato sulle pareti di una provetta di polipropilene, la semplice decantazione del surnatante è sufficiente per terminare la competizione. Nella provetta rimane, perciò, soltanto la frazione di ormone legata all’anticorpo, la cui quota marcata è inversamente proporzionale a quella preesistente nel campione. Dal conteggio della radioattività, mediante contatore gamma, è possibile quindi ricavare per interpolazione, la quantità di ormone presente, basandosi su una curva standard opportuna ed allestita in parallelo insieme ai campioni. Il range di concentrazione utile, nel caso di dosaggio di plasma bovino, si sposta verso le basse concentrazioni e va da 2.5 a 200 ng/ml.

La matrice di tale curva è costituita da siero umano; la diversità di matrice fra standards e campioni di plasma bovino ha richiesto qualche prova preliminare di accuratezza per verificare l’applicabilità del kit. L’anticorpo ha una elevata specificità per il cortisolo ed una estremamente bassa crossreattività per gli steroidi presenti normalmente, in condizioni fisiologiche, nel sangue; mentre si osserva una crossreattività del 76% nei confronti del prednisolone (presente in caso di trattamento con prednisolone, prednisone o altri corticosteroidi sintetici strutturalmente ad essi correlati).

Il dosaggio del cortisolo si effettua sul plasma ottenuto prelevando il sangue in provette contenenti Li-eparina ed eliminando le cellule per la centrifugazione, suddiviso poi in aliquote e congelato a – 20°C: Al momento del dosaggio si porta il plasma a temperatura ambiente immergendo i campioni per pochi minuti in bagno a 37°C, mescolando frequentemente per uniformare la temperatura e togliendoli appena scongelati. Da prove effettuate per stabilire l’interferenza degli anticoagulanti nel dosaggio, risulta che il plasma ottenuto con EDTA fornisce risultati significativamente più elevati sia rispetto al siero sia al plasma con eparina.

Il metodo non risente della presenza di emolisi e di alte concentrazioni di bilirubina, mentre la presenza di lipemia può interferire con il dosaggio, perciò i campioni lipemici devono essere chiarificati mediante ultracentrifugazione.

La concentrazione proteica non influisce, in maniera significativa, sul legame dell'anticorpo data l'elevata specificità di quest' ultimo con l'antigene; si è visto che anche concentrazioni proteiche doppie, rispetto al normale, non interferiscono significativamente.

SCHEDE UTILIZZATE NEL MODELLO SDIB (Sistema Diagnostico Integrato Benessere)

Il modello SDIB (Sistema Diagnostico Integrato Benessere) utilizzato per la valutazione del benessere animale negli allevamenti di bovine da latte messo a punto dall'Istituto di Zootecnica ed utilizzato nella presente ricerca è composto da tre sottosistemi:

- Allevamento;
- Alimentazione;
- Animale.

Il Cluster Allevamento include due componenti: il sistema allevamento (composta da 22 indicatori) e la sua gestione (composta da 13 indicatori). Il Cluster Alimentazione considera invece gli alimenti (composta da 10 indicatori) e le razioni (composta da 5 indicatori) ed infine il Cluster Animale considera la fisiologia, stato di salute e riproduzione (composta da 15 indicatori), la produzione (composta da 3 indicatori) e il comportamento (composta da 12 indicatori).

In Tabella 1, 2 e 3 vengono riportati i vari aspetti considerati nei tre clusters del modello, le relative componenti, gli aspetti e gli indicatori; in queste tabelle sono inoltre riportati i punteggi attribuiti a ciascuno di essi.

Tabella 1. Punteggi pesati di ciascun componente, aspetto e indicatore incluso nel Cluster Allevamento del modello SDIB (Sistema Diagnostico Integrato Benessere).

Cluster	Componente	Aspetto	Indicatore
Allevamento (30)	Ricoveri e impianti (18)	Strutture (6)	Caratteristiche generali (0,60)
			Aperture per la ventilazione/illuminazione (0,66)
			Scivolosità del pavimento (0,78)
			Disponibilità dei passaggi (0,78)
			Area alimentazione (accessibilità all'alimento) (0,78)
			Area di riposo (tipologia e dimensioni) (1,80)
		Aree e sterne (0,60)	
		Disponibilità spazi (4)	Cubatura (0,80)
			Superficie coperta capo adulto (1,60)
			Spazio area di riposo (1,20)
			Spazio mangiatoia (0,40)
		Condizioni microclimatiche (4)	Volume di ventilazione minimo (0,50)
			Bilancio termico invernale (0,50)
			Bilancio termico estivo (1,50)
			Sistemi di raffrescamento (1,50)
		Attrezzature (4)	Impianto di mungitura (dimensioni) (0,60)
			Impianto di mungitura (adeguatezza) (1,20)
			Disponibilità di acqua (0,40)
	Illuminazione (0,30)		
	Sistemi di raffrescamento nella sala di mungitura e nella sala di attesa (0,80)		
	Bagno per i piedi (0,30)		
	Impianti aggiuntivi (0,40)		
	Gestione (12)	Ricoveri e impianti (6)	Igiene dell'area di alimentazione (0,60)
			Igiene dell'area di riposo (2,10)
			Igiene del sistema di irrigazione (2,10)
			Impianto di mungitura (0,72)
			Impianto distribuzione alimenti (0,48)
		Animali (6)	Bovine in asciutta (1,10)
			Steaming up (1,10)
			Partorienti (1,10)
Bovine in lattazione (0,25)			
Primipare (0,25)			
Area infermeria (0,25)			
Vitelli (0,85)			
Decornazione (0,25)			

Tabella 2. Punteggi pesati di ciascun componente, aspetto e indicatore incluso nel Cluster Alimentazione del modello SDIB (Sistema Diagnostico Integrato Benessere).

Cluster	Componente	Aspetto	Indicatore
Alimentazione (30)	Alimenti (18)	Modalità di conservazione (4)	Strutture per conservare l'insilato (2,0)
			Strutture per conservare il foraggio (1,0)
			Strutture per conservare il concentrato (1,0)
		Qualità (10)	Valutazione dell'insilato (4,0)
			Valutazione del foraggio (4,0)
			Valutazione del concentrato (1,0)
			Analisi sugli alimenti (1,0)
		Gestione (4)	Sistema per la distribuzione degli alimenti (2,0)
			Caratteristiche fisiche dell'unifeed* (2,0)
			Sequenza per la distribuzione degli alimenti* (2,0)
	Razioni (12)	Razioni Pre parto (5)	Bovine in asciutta (sostanza secca ingerita, proteine grezze, integrazione vitaminica) (3,0)
			Bovine in steaming up (sostanza secca ingerita, proteine grezze, integrazione vitaminica) (2,0)
		Razioni Post parto (7)	Bovine in fase iniziale di lattazione (sostanza secca ingerita, energia, proteine grezze, NDF, amido) (3,0)
			Bovine in fase intermedia di lattazione (sostanza secca ingerita, energia, proteine grezze, NDF, amido) (2,0)
			Bovine in fase avanzata di lattazione (sostanza secca ingerita, energia, proteine grezze, NDF, amido) (2,0)
Bovine in fase avanzata di lattazione (sostanza secca ingerita, energia, proteine grezze, NDF, amido) (2,0)			

* = punteggio alternativo dato in base alla modalità di distribuzione degli alimenti utilizzata nell'allevamento

Tabella 3. Punteggi pesati di ciascun componente, aspetto e indicatore incluso nel Cluster Animale del modello SDIB (Sistema Diagnostico Integrato Benessere).

Cluster	Componente	Aspetto	Indicatore
Animale (40)	Fisiologia, stato di salute e riproduzione (24)	Aspetto esteriore (5)	BCS* (2,0)
			Pelo e scolo nasale e/o lacrimazione (0,50)
			Cleanliness score* (1,50)
			Ferite e lesioni (collo, spalle, colonna spinale, bacino, costole) (0,60)
			Prassiti esterni * (0,40)
		Funzionalità digerente (4)	Rumination score** (2,0)
			Faeces score* (2,0)
		Mammella (4)	Teat score**(2,0)
			Lesioni ai capezzoli, alla mammella e ai quarti ciechi **(0,80)
			Contenuto delle cellule somatiche nel latte di massa (1,20)
		Arti e piedi (4)	Foot Score* (1,50)
			Trimming score* (1,50)
	Lesioni alle ginocchia, ai garretti, presenza di gonfiore* (1,00)		
	Riproduzione (3)	FSI (Fertility Status Index)*** (2,40)	
		Aborti e mortalità al parto (0,60)	
	Produzione (8)	Produzione di latte (4)	Produzione di latte (4,0)
			Contenuto in grasso delle latte di massa (3,0)
		Composizione del latte (4)	Contenuto in proteine delle latte di massa (1,0)
	Comportamento (8)	Interazione sociale e contatto con l'uomo (3)	Ritiro dell'animale quando l'osservatore si avvicina alla mangiatoia
			Test di approccio animale volontario (0,50)
			Test di evasione (0,50)
			Reazioni dell'animale all'ispezione da parte dell'osservatore* (0,50)
			Interazioni sociali (0,50)
Stereotipie (0,50)			
Interazione animale - ambiente (5)		Decubito e in piedi (1,0)	
		Cow Comfort index (1,20)	
		Indice dell'utilizzo del box di stalla (0,60)	
		Indice degli animali che stanno in piedi in cuccetta con due arti dentro e due fuori (0,60)	
Posizioni anormali assunte dagli animali in decubito (0,80)			
Distribuzione degli animali nell'area di riposo (0,80)			

* = valutato su un numero rappresentativo di bovine in asciutta, fase iniziale e in fase avanzata di lattazione.

** = valutato su un numero rappresentativo di bovine in fase iniziale e in fase avanzata di lattazione.

*** = calcolato considerando il tasso di rimonta, tasso di concepimento, tasso di concepimento alla prima inseminazione e intervallo tra i due parti.

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

ACTH - Adrenocorticotropic hormone
AGEs – Advanced Glycation Endproducts
AIA – Associazione Italiana Allevatori
ALP - Fosfatasi alcalina
AP - Acute Phase
APA – Associazione Provinciale Allevatori
APO B-100 – Apolipoproteina B-100
- **APP** - Proteine negative di fase acuta
+ **APP** - Proteine positive di fase acuta
BCS - Body Condition Score
β-OHB - acido β- idrossibutirrico
CRF – corticotropina
CRH – Corticotropin Releasing Hormone
CuCp - ceruloplasmina
DIM – Distanza Iterparto Media
FSH – Ormone follicolo stimolante
G- Hb – Glycated Hemoglobin
GGT - γ-glutamyl transferasi
GnRH – Gonadotropine Releasing Hormone
GOT -Aspartato amino transferasi
GSP – Glycated Serum Protein
HbA1c – Glycated Haemoglobin
HPA - Hypothalamic-Pituitary-Adrenal-Axis
IFN-γ – Interferon -γ
Ig – Immunoglobuline
IL – Interleukin
LAI - Liver Activity Index
LFI – Liver Functionality Index
LEM – Leucocyte Endogenous Mediator
LDH – Lattato deidrogenasi
LH – Ormone luteinizzante
NDF - Neutral Detergent Fiber
NEFA - Non- Esterified Fatty Acids
NO_x - metaboliti totali dell'ossido nitrico
NO₂ - nitriti

NO₃ - nitrati

PCV - Packed Cell Volume (Ematocrito)

PON - Paraoxonasi

RBP - Retinol Binding Protein

ROM - Reactive Oxygen Metabolite

SAM – Asse Simpatico Surrenale Midollare

SDIB – Sistema Diagnostico Integrato Benessere

SCC - Milk Somatic Cells Count

SNC - Central Nervous System

TGI - Tiergerechtheitsindex

UFL - Unità foraggiere Latte

VP - Vasopressina

BBLIOGRAFIA

Abeni F., Calamari L., Stefanini L., Pirlo G., 2000. Effects of Daily Gain in Pre- and Postpubertal Replacement Dairy Heifers on Body Condition Score, Body Size, Metabolic Profile and Future Milk Production. *J. Dairy Sci.*, 83, 1468-1478.

Abeni, F., Calamari, L., Stefanini, L., 2007. Metabolic conditions of lactating Friesian cows during hot season in Po valley. 1. Blood indicators of heat stress. *Int. J. Biometeorol.* 52:87-96.

ADAS (Agricultural Development and Advisory Service). (1986). Condition Scoring of dairy cows. Publ. 612, Agric. Dev. Advisory Service, Min. Agric., Fisheries Food, Lion House, Alnwick, Northumberland, UK.

Aguilera G., Lightman S.L., Kiss, A., 1993. Regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis during water deprivation. *Endocrinology* 132: 241-248.

Alban L., Ersbøll A. K., Bennedsgaard T. W., Johnsen P.F. (2001). Validation of welfare assessment methods at herd level: an example. *Actagric. Scand., Section A, Animal Science Supplementum* 30, 99- 102.

Alvarez, M.B., Johnson, H.D., 1973. Environmental heat exposure on cattle plasma catecholamines and glucocorticoids. *J. Dairy Sci.* 56: 189.

Amadori, M., 2007. Aspects of adaptation physiology in farm animals. In: A. Vitale, G.Laviola, A. Manciococco and W. Adriani. (eds.) *Human non human animals interactions: contextual, normative and applicative aspects.* Rapporti ISTISAN, Roma, Italy, pp.46-52.

American Diabetes Association., 2004. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* .; 27: (Suppl. 1): S 15-35.

Amon, T., Amon, B., Ofner E., and Boxberger J., 2001. Precision of Assessment of animal welfare by the TGI 35 L' Austrian Needs Index. *Acta. Agric. Scand. Sect. A. Anim. Sci. Suppl.* 30, 114-117.

Antoni, F.A., 1986. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: Advances since the discovery of 41 residue CRF. *Endocrine Rev.* 7: 351-378.

Armbruster, D.A., 1987. Fructosamine: Structure, Analysis, and Clinical Usefulness. *Clin.Chem.* 33/12, 2153-2163.

Arnone, M., Dantzer, R., 1980. Does frustration induce aggression in pigs? *Appl. Anim. Ethol.* 6: 351.

Appelhans, B.M., Luecken, L.J., 2008. Heart rate variability and pain: associations of two interrelated homeostatic processes. *Biological Psychology.* Vol. 77, Issue: 2. pp. 174-182.

Arthington, J.D., Eicher, S.D., Kunkle, W.E., Martin, F.G., 2003. Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. *J. Anim. Sci.* 81: 1120-1125.

Arthington, J.D., Spears, J.W., Miller D.C., 2005. The effect of early weaning on feedlot performance and measures of stress in beef calves. *J. Anim. Sci.* 83: 933-939.

Assenat, E., Gerbal- Chaloin S., Larrey, D., Saric, J., Fabre, J.M., Maurel, P., Vilarem, M.J., Pascussi, J.M., 2004. Interleukin 1beta inhibits CAR- induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance. *Hepatology* 40: 951-960.

Bartussek, H., 1999. A review of the animal needs index (ANI) for the assessment of animals' well-being in the housing systems for Austrian proprietary products and legislation. *Livest. Prod. Sci.* 61:179-192.

Bartussek, H., 2001. An historical account of the development of the animal needs index ANI-35L as part of the attempt to promote and regulate farm animal welfare in Austria: an example of the interaction between animal welfare science and society. *Acta Agr. Scand. A-AN* 30 (Suppl.):34-41.

Bates, G., 1998. Corn silage. Home page address: www.utextension.utk.edu/sdfiles/sp434.pdf

- Baugh, J.A., Donnelly, S.C., 2003. Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. *J. Endocrinol.* 179: 15-23.
- Baxter, M.R., 1988. Needs- behavioural or psychological? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 19: 345-348.
- Beisel, W.R., Pekarek, R.S., Wannemacher R.W., 1974. The impact of infectious disease on trace element metabolism of the host. In: *Trace elements in man and animals*, pp. 217-240. (W.G. Hoekstra, ed.) University Park, Press, Baltimore.
- Bentham, J., 1789. *Introduzione ai principi della morale e della legislazione*. UTET, Torino.
- Bertoni, G., 1985b. Il razionamento tradizionale della lattifera alla luce delle nuove conoscenze. "Informatore Zootecnico", 32 (18), 60-69.
- Bertoni, G., Piccioli Cappelli F., Calamari, L. e Trevisi E., 1989. Digestive upsets of ruminants: possible role of endotoxins and or histamine, *Proc. VIIth Conf. "Production disease in farm animals"*. New York, pp. 370-373.
- Bertoni, G., Lombardelli, R., Trevisi E., 1991. Variazioni endocrine indotte nelle bovine dalla somministrazione di endotossine ed istamina. pp. 175-185 in *Proc. 9th Nat. Congr. ASPA, Roma, Italy*.
- Bertoni G., 1994. Stress: effetti sulla qualità e sulla quantità di latte nella bovina. *La certificazione dei prodotti alimentari: il caso del latte*. Ed. G.Piva, G.Enne, Il Mulino (Bologna), 217 – 249.
- Bertoni G., 1998). Effects of heat stress on endocrine-metabolic and reproductive status of the dairy cows. *Zoot. Nutr. Anim.*, 6, 273-282.
- Bertoni G., 1999. Welfare, health and management of dairy cows. In: G.Piva, G.Bertoni, F. Masoero, P.Bani and L.Calamari (eds.) *Recent progress in animal production science*. Franco Angeli, Milano, Italy, pp. 59-78.
- Bertoni, G., Calamari L., Trevisi, E., 1999. Valutazione del benessere nelle lattifere. *Inf. Agr.* 55 (35) Suppl. 5-66.

Bertoni, G., Calamari L., Trevisi, E., 2000. Nuovi criteri per l'individuazione dei valori di riferimento di taluni parametri ematici in bovine da latte. *La Selezione Veterinaria*. Suppl.: S261-S268.

Bertoni, G., Trevisi, E., 2001. Effetti degli acidi grassi polinsaturi $\omega 3$ sul sistema immunitario e sull'attività riproduttiva degli animali da reddito. *Atti 3° Convegno Nazionale "Acidi grassi polinsaturi $\omega 3$ e antiossidanti."*, *Progress in Nutrition* 3 (2): 17-25.

Bertoni, G., Trevisi, E., Ferrari A., Archetti I., 2003. Preliminary studies on compatibility between high yield levels and the well being of dairy cows. *Vet. Res. Comm.* 27 (Suppl.1): 639-641.

Bertoni G., Calamari L., 2005. Strumenti di valutazione del benessere negli allevamenti di Bovine da latte. *Atti della Società Italiana di Buiatria* vol. XXVII, Giornata Buiatrica "Il benessere animale nell'allevamento bovino", Carrù (CN) 26 Giugno 2004: 423 – 440.

Bertoni, G., Trevisi, E., Lombardelli, R., Bionaz, M., 2005a. Plasma cortisol variations in dairy cows after some usual or unusual manipulations. *Ital. J. Anim. Sci.* 4 (suppl. 2): 200-202.

Bertoni, G., Trevisi, E., Lombardelli, R., Calamari, L., 2005b. The ACTH challenge test to evaluate the individual welfare condition. *Proc. 56th Ann. Meet. EAAP*, Uppsala, Sweden.

Bertoni, G., Calamari, L., 2006. Valutazione del benessere animale. *Atti Convegno di studio "Il benessere animale e la qualità delle produzioni nei piccoli ruminanti"*. Sassari 16 dicembre, I Georgofili, Quaderni 2005-VII, Sezione Centro Ovest, Ed. Avenue Media (BO), 33-46.

Bertoni, G., Trevisi, E., Gandolfi, E., Lombardelli, R., 2006a. Factors of plasma cortisol changes in dairy cows. Page 19 in *Proc. 79th Nat. Congr. SIBS*, Bologna, Italy.

Bertoni, G., Trevisi, E., Ferrari, A.R., Gubbiotti, A., 2006b. The dairy cows performances can be affected by inflammations occurring around calving. Page 325 in *Proc. 57th Ann. Meet. EAAP*, Antalya, Turkey.

Bertoni, G., Calamari, L., Trevisi, E., 2007. How to define and evaluate welfare in modern dairy farms. Pp. 590-606 in Proc. 13th Int. Conf. on Production Diseases in Farm Animals, Leipzig, Germany.

Bertoni G., Trevisi, E., Han, X., Bionaz, M., 2008. Effects of inflammatory Conditions on Liver Activity in the Puerperium and Consequences for the Performance in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*91: 3300-3310.

Beauchemin K.A., 1991. "Ingestion and Mastication of feed by Dairy Cattle", *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* - Vol. 7, n° 2, July 1991

Bionaz, M., Trevisi, E., Calamari, L., Librandi A., Ferrari A., Bertoni G., 2007. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions and liver function in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 1740-1750.

Blatchford, D., Holzabauer M., Ingram D.L., Sharman D.F., 1978. Responses of the pituitary adrenal system of the pig to environmental changes and drugs. *Brit. J. Pharmacol.* 62: 241.

Bondurant, R.H., 2001. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J.Anim.Sci.*, 77 (Suppl. 2): 101-110.

Bonnette, E.D., Kornegay, E.T., Lindemann, M.D., Notter, D.R., 1990. Influence of two supplemental vitamin E levels and weaning age on performance, humoral antibody production and serum cortisol levels of pigs. *J. Anim. Sci.* 52: 594.

Boissy, A., Bouissou, M.F., 1988. Effects of early handling on heifer's subsequent reactivity to humans and to unfamiliar situations. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 20, 259-273.

Bouissou, M.F., Boissy, A., Le Neindre, P., Veissier, I., 2001. The social behaviour of cattle. In: L.J. Keeling and H.W. Gonyoy (eds.) *Social Behaviour of Farm Animals*. CABI International, Wallingford, UK, pp 113-145.

Bracke, M.B.M., Spruijt, B.M, Metz, J.H.M., 1999. Overall animal welfare assessment reviewed. Part1: Is it possible?. *Neth. J. Agr. Sci.* 47:279-291.

Brambell Report, 1965. Report of the Technical Committee to enquire into the welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems. Her Majesty's Stationery Office, London UK.

Breuer, K., Hemsworth, P.H., Colemann, G.J., 1997. The influence of handling on the behaviour and productivity of lactating heifers, Proc. 31st Intern. Congress Intern Soc. Appl. Ethology, Research Institute of Animal Production, Prague, Czech, Republic and the Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Slovakia.

Broom, D.M., 1986. Indicators of poor welfare. *Br. Vet. J.* 142: 524-526.

Broom, D.M., 1988. Needs, freedoms and the assessment of welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 19: 384-386.

Broom, D.M., 1988. The scientific assessment of animal welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 20: 5-19.

Broom, D.M., 1991. Animal Welfare: concepts and measurement. *J. Anim. Sci.* 69: 4167- 4175.

Broom, D.M., Johnson, K.G., 1993. *Stress and Animal Welfare*. Chapman and Hall, London UK.

Broom, D.M., 1998. Welfare, stress and evolution of feelings. *Adv. Stud. Behav.* 27: 371- 403.

Broom, D.M., 2003. Transport stress in cattle and sheep with details of physiological, ethological, and others indicators. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 110: 83-89.

Broom, D.M., 2006. Behaviour and welfare in relation to pathology. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 97: 73-83.

Broom, D.M., Fraser, A.F., 2007. *Domestic animal behaviour and welfare*. 4th Ed. CAB International, Oxfordshire, UK.

Brownlee, M., Cerami, A., Vlassara, H., 1988. Advanced glycosylation products in tissue and biochemical basis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.* 318: 1315-1321.

Bruss, M.L., 1997. Lipids and ketones. Pages: 83-115 in *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed. By J.J. Kaneco, J.W., Harvey, M.L., Bruss, ed Academic Press in London.

Caddel, J.L., Allen, E., 1993. Hay judging. Home page address: <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2556/F-2588web.pdf>

Calamari L., Lombardelli R., Bertoni G., 1982. Evoluzione di alcuni parametri ematochimici nel primo mese di vita in vitelli Frisoni e meticcii. *Atti 36° Conv. Naz. SISVet*, 385-386.

Calamari, L., Maianti, M.G., Stefanini, L., 2003. Effect of space availability at feed bunk and rest area on metabolic conditions and productive responses in dairy cows. *Ital. J. Anim. Sci.* 2 (Suppl.1):281-283.

Calamari, L., M. Bionaz, E. Trevisi, and G. Bertoni. 2004. Preliminary study to validate a model of animal welfare assessment in dairy farms. 5th Congress of the European Society for Agricultural and Food Ethics (EURSAFE), Eds. De Tavernier J. & Aert S., Leuven, Belgium 2-4 Sept., 38-42.

Calamari, L., Bertoni, G., 2009. Model to evaluate welfare in dairy cow farms. *Ital. J. Anim. Sci.* 8 (suppl. 1): 281-283.

Cannon, W.B., 1935. Stresses and strains of homeostasis. *Am. J. Med. Sci.* 189:1.

Cantley, C.E.L., Ford, C.M. & Heath, M.F., 1991. Serum fructosamine in ovine pregnancy toxemia: a possible prognostic index. *Veterinary Record* 128, 525-526.

Capdeville, J., Veissier, I., 2001. A method of assessing welfare in loose, housed dairy cows at farm level, focusing on animal observations. *Acta Agr. Scand. A-AN* 30 (Suppl.):62-68.

Cappa, V., Trevisi E., Bertoni, G., 1989. Variazioni ematiche nel primo mese di lattazione in bovine di allevamenti con o senza problemi "post-partum". *Zoot. Nutr. Anim.* 15, 645-660.

Carenzi, C., and M. Verga. 2007. Definition of welfare. *Ital. J. Anim. Sci.* (in press).

Carenzi, C., Verga, M., 2009. Animal welfare: review of the scientific concept and definition. Ital. J. Anim. Sci.vol.8 (suppl.1): 21-30.

Cassens, R.G., Marple, D.N., and Eikelenboom. 1975. Animal physiology and meat quality. Adv. Food Res. 21: 71.

Ceballos, A., Gómez, P.M., Vélez, M.L., Villa, N.A., & López L.F., 2002a.Variation in biochemical indicators of energy balance in relation to production in dairy cows in Manizales, Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 15: 13-25.

Chandalia, H.B., Krishaswamy, P.R., 2002. Glycated Hemoglobin. Current Science, Vol. 83, n. 12.

Chiang, W., Roth, J.A., Andrews, J.J., 1990. Influence of recombinant bovine interferon gamma and dexamethasone on pneumonia attributable to Hemophilus sommus in calves. J. Vet. Res. 51: 5, 759-762.

Cohen, Alfred, S., 1986. Animal experimentation. J. Halacha Contemporary Society. Vol. 11, pp. 19-32.

Chowdrey HS., Jessop D.S., Lightman S.L., 1991. Altered Adrenocorticotropin, corticosterone and oxytocin responses to stress during chronic salt load. Neuroendocrinology 54: 635-638.

Colditz, I.G., 2002. Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. Livest. Prod. Sci. 75: 257-268.

Commissione ASPA (Associazione Scientifica di Produzione Animale). 1998. "Guida all'interpretazione dei profili metabolici". Commissione: Valutazione dell'assetto endocrino metabolico degli animali in produzione zootecnica. Edizione: Università degli Studi di Perugia.

Cooper, T.R., Trunkfield, H.R., Zanella, A.J., Booth, W.D., 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay for cortisol in the saliva of man and domestic farm animals. J. Endocrinol. 123: R13-16.

Cooper, J.J., 2004. Consumer demand under commercial husbandry conditions: practical advice on measuring behavioural priorities in captive animals. *Anim. Welfare* 13: 47-56.

Coppo, J.A., 2001. Evolution of fructosaminaemia and glucaemia during the growth of unweaned and early weaned Half-breed Zebu calves. *Veterinary Research Communications*, 25: 449-459.

Curtis S.E. 1985. What constitutes Animal well – being? In Moberg G.P., editor. *Animal Stress*. American Physiological Society, Bethesda, Maryland. pp. 1–14.

Dallaman, M.F., Akana, S.F., Scribner, K.A., Bradbury, M.J., Walker, C.D., Strack A.M., Casio, C.S., 1992. Stress, feedback and facilitation in the hypothalamus pituitary adrenal axis. *J. Neuroendocrinol* 4: 517-526.

Daniel, M., O’Dea, K., Rowley, K.G., McDermott, R., Kelly, S., 1999. Glycated haemoglobin as an indicator of social environmental stress among indigenous versus westernized populations. *Prev. Med.* 29: 405-413.

Dantzer, R., 1977. Etudes des effets du diazepam sur le comportement explorateur du porc. *Psychopharmacology* 51: 317.

Dantzer, R., Mormède, P., 1981a. Influence du mode d’ élevage sur le comportement et l’activité hypophyso-corticosurrenaliennne du porcelet. *Reprd. Nutr. Dével.* 21: 661.

Dantzer, R., 1986. The pig as a model for behavioural research. *Laboratory Animal Science*. Vol. 36; Issue: 4; pp.362-365.

Dantzer, R., 2006. Cytokine, sickness, behavior and depression. *Neurologic clinics*. Vol. 24, Issue: 3, pp. 441.

Das, B.S.; Satpathy, S.K.; Mohanty, S; Bose, T.K., 1992. Influence of serum albumin and total protein on fructosamine measurement. *Indian of Medical Research*. Section B- Biomedical Research other than infectious diseases, 96-60.

Dawkins, M.S., 1980. *Animal suffering, the science of animal welfare*. Chapman and Hall, London UK.

Dawkins, M.S., 1990. From an animal's point of view: motivation, fitness and animal welfare. *Behav. Brain. Sci.* 13: 1-61.

Dawkins, M.S., 1993. *Through Our eyes only? The Search for Animal Consciousness*. Freeman, Oxford UK.

de Jong IC, PELLE IT, van de Burgwal JA, Lambooy E, Korte SM, Blokhuis HJ, Koolhaas JM., 2000. Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiol Behav.* ;68(4):571-8.

Dellabona L. (2006). "Valutazione del benessere negli allevamenti di lattifere mediante un sistema integrato e sua validazione con la determinazione del cortisolo". Tesi di Laurea, Istituto di Zootecnica , Facoltà di Agraria di Piacenza.

Delpierre, G., Collard, F., Fortpied, J., Van Schaftingen, 2002. Fructosamine 3-kinase is involved in an intracellular deglycation pathway in human erythrocytes. *Biochem. J.* 365, 801±808 (Printed in Great Britain) 801.

de Passille', A.M., Christopherson, R., Rushen, J., 1993. Non-nutritive sucking by the calf and postprandial. Secretion of insulin, CCK and gastrin. *Physiol. Behav.* 54, 1069–1073.

Désiré, L., Boissy, A., Veissier, I., 2002. Emotions in farm animals: a new approach to animal welfare in applied ethology. *Behav. Process.* 60: 165-180.

Dirksen G., Stöber, M., 1982. La sindrome di lipomobilizzazione della vacca da latte. *Praxis. Vet.* 3 (4), 5-11.

Dobson, H., Tebble, J.E., Smith, R.F., Ward, W., R., 2001. Is stress really all that important? *Theorigenology* 55: 65-73.

Dockès, A.C., Kling-Eveillard, F., 2006. Farmers' and advisers' representations of animals and animal welfare. *Livest. Sci.* 103: 243-249.

Dominiczak, M.H., 1991. The significance of the products of the Maillard (browning) reaction in diabetes. *Diabetic Medicine* 8, 505-516.

Drakley, J.K., 1999. ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?. *J. Dairy Sci.* 82: 2259-2273.

Duncan, I.J.H., Dawkins, M.S., 1983. The problem of assessing "well-being" and "suffering" in farm animals. In : D. Smidt (ed.) *Indicators relevant to farm animal welfare*. Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands, pp. 13-24.

Duncan, I.J.H., 2002. Poultry welfare: science or subjectivity? *Brit. Poultry Sci.* 43: 643-652.

Duncan, I.J.H., 2005. Science based assessment of animal welfare: farm animals. *Rev. Sci. Tech. OIE.* 24: 483-492.

Duncan, I.J.H., 2006. The changing concept of animal sentience. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 100:11-19.

Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T., Webster, G., 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72, pp. 68-78.

EFSA, 2006. The risks of poor welfare in intensive calf farming systems. An update of the Scientific Veterinary Committee Report on the Welfare of Calves. *EFSA Journal* 366: 1-36.

Elsasser, T.H., 1992. The impact of production disease stress on the character of growth and productivity of food producing animals. *Proc. VIII Int. Conf. "Production Diseases in Farm Animals"*. (Berne). pp. 1-15.

Elsasser, T.H., Steele, N.C., Fayer, R., 1995. Cytokines, stress and growth modulation. In: M.J. Meyers and M.P.M. Murthaugh (eds.) *Cytokines in animal health and disease*. Dekker Inc., New York, NY, USA, pp. 261-290.

Elsasser, T.H., Kahal, S., Steele, C., Rusmeyer, T.S., 1997. Nutritional modulation of somatotrophic axis-cytokine relationships in cattle: a brief review. *Comp. Biochem. Physiol.* 116A (3): 209-221.

Elsasser, T.H., Klasing K.C., Filipov, N. and Thompson F., 2000. The metabolic consequences of stress: Targets for stress and priorities of nutrient use. Pages 77-110 in *The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare.* G.P. Moberg and J.A. Mench, ed. CABI Publishing, New York, NY.

Esselmont, R.J., Eddy, R.G., 1977. The control of cattle fertility: the use of computerized records. *Brit. Vet. J.* 133:346-355.

Ewbank, R., 1973. Use and abuse of the term stress in husbandry and welfare. *Vet. Rec.* 92: 709.

FAWC, 1993. *Second Report on Priorities for Research and Development in Farm Animal Welfare.* MAFF Publ. Tolworth, London, UK.

Faye, B., Barnouin, J., 1985. Objectivation de la propreté des vaches laitières et des stabulations. L'indice de propreté. *Bull. Tech. CRZV, Theix, INRA.* 59:61-67.

Faure, J.M., 1975. Etude des liaisons entre comportement en open field et émotivité chez le jeune poussin. *Ann. Génét. Sél. Anim.* 7: 197.

Fisher, A.D., Verkerk, G.A., Morrow, C.J., Matthews, L.R., 2002. The effects of feed restriction and lying deprivation on pituitary–adrenal axis regulation in lactating cows. *Livest Prod. Sci.* 73:255-263.

Fleck, A., 1989. Clinical and nutritional aspects of changes in acute phase proteins during inflammation. *Proc. Nutr. Soc.* 48: 347-354.

Flores M., Kiss, A., Aguilera, G., 1992. Differential changes in brain and pituitary glucocorticoid receptors during repeated immobilization stress. 74th Annual Meeting of the Endocrine Society, San Antonio, TX, (Abstrc. 1107).

Fluckiger, R., Woodtli, T., Berger, W., 1987. Influence of the protein concentration on fructosamine values. *Diabetologia*, Vol. 30, Issue: 7, pp. A519.

Formigoni, A., Trevisi, E., 2003. Transition cow: interaction with fertility. *Vet. Res. Comm.* 27 (Suppl. 1): 143-152.

Fraser, A.F., and D.M. Broom. 1990. *Farm animal behaviour and welfare*. 3rd ed. Baillière Tindall, London.

Fraser, D., 1995. Science, values and animal welfare: exploring the 'inextricable connection'. *Anim. Welfare* 4:103-117.

Fraser, A.F., Broom, D.B., 1997. *Farm animal behaviour and welfare*. CAB International, London, UK.

Fraser, D, 1999. Animal ethics and animal welfare science: bridging the two cultures. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 65: 171-189.

Fregonesi, J.L., Leaver, J.D., 2001. Behaviour, performance and health indicators of welfare for dairy cows housed in strawyard or cubicle systems. *Livestc. Prod. Sci.* 68: 205-216.

Graham, P. A., 1995. *Clinical and epidemiological studies on canine diabetes mellitus*. PhD Thesis, University of Glasgow.

Grandin, T., 1993. *Livestock Handling and Transport*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

Grandin, T., 1997. Assessment of stress during handling and transport. *J. Anim. Sci.*, 75, 249-257.

Grant, R.J., Albright, J.L., 2001. Effect of animal grouping on feeding behavior and intake of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 84(Suppl. E):E156-E163.

Grasso, F., Napolitano F., De Rosa, G., Quarantelli, T., Serpe, L., Bordi, A., 1999. Effect of pen size behavioural, endocrine and immune response of water Buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *J. Anim. Sci.* 77: 2039-2046.

Greenspan, F.S., Forsham, P.H., 1986. In "Basic & Clinical Endocrinology" LMP, Los Altos, California.

Griffin, D. 1976. *The Question of Animal Answereness*. Rockefeller, New York, NY, USA.

Griffin, J.F.T., Thomson, A.J., Cross, J.P., Buchan, G.S., e Mackintosh C.G., 1990. The impact of domestication on red deer immunity and disease resistance. *The Biology Deer Mississippi Conference- Springer –Verlong*. 120-125.

Grimble, R.F., 1990. Nutrition and cytokine action, in "Nutrition Research Reviews". 3, pp.193-210.

Gruffat, D., Durand, D., Chilliard, Y., Williams, P., Bauchart, D., 1997. Hepatic gene expression of Apolipoprotein B100 during early lactation in uderfed high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 657-666.

Gruys, E., Toussaint M.J.M., Landman, W.J.M., Tivapasi, M., Chamanza R., van Veen, L., 1998. Infection, inflammation and stress inhibit growth. Mechanisms and non-specific assessment of the processes by acute phase proteins. Pp. 72-87 in *Proc. 10th Int. Conf. on Production diseases in farm animals*, Wageningen The Netherlands.

Gruys, E., Toussaint M.J.M., Upragarin, N., Van Ederen, A.M., Adewuyi, A.A., Candiani, D., Sabeckiene, J., 2005. Acute phase reactants, challenge in the near future of animal production and veterinary medicine. *J. Zheijang Univ. Sci.* 6B:1045-1056.

Halperin, M.L., Kamel, K.S., 1998. Potassium. *Lancet* 352: 135-140.

Hasegawa, N., Nishiwaki, A., Sugawara, K., Ito, I., 1997. The effects of social exchange between two groups of lactating primiparous heifers on milk production, dominance order, behaviour and adrenocortical response. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 51 (1/2): 15-27.

Hauger, R.L., Aguilera, G., 1992. Regulation of corticotropin releasing hormone receptors and hypothalamic pituitary adrenal axis responsiveness during cold stress. *J. Neuroendocrinol* 4: 617-624.

Hay, M., Mormède, P., 1998. Urinary excretion of catecholamines, cortisol and their metabolites in Meishan and Large White sows: validation as a non-invasive and integrative assessment of adrenocortical and sympathoadrenal axis activity. *Vet. Res.* 29: 119-128.

Heath, M.F.; Connan, R.M., 1991. Interaction of ostertagia and nematodirus species in sheep and the potential of fructosamine determination in monitoring gastrointestinal parasitism. *Research in veterinary Science*, 51 (3): 322-326.

Hemsworth, P.H., Barnett, J.L., Breuer, K., Coleman, G.C., Matthews, L.R., 1995. An investigation of the relationships between handling and human contact and the milking behaviour, productivity and welfare of commercial dairy cows. Research Report on Dairy Research and Development Council Project, Attwood, Australia.

Hemsworth, P.H., Coleman, G.J., 1998. Human-livestock interactions. The stockperson and the productivity and welfare of intensively farmed animals. CAB International, Bristol, UK.

Hewson, C.J. 2003. What is animal welfare? Common definitions and their practical consequences. *Can. Vet. J.* 44: 496-499.

Hogan, J.P., Phillips, C.J.C., 2008. Nutrition and the welfare of ruminants. *ARBS Annual Review of Biomedical Sciences* 10:T33-T50.

Hopster H, van der Werf JT, Erkens JH, Blokhuis HJ., 1999. Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. *J Anim Sci.* 77(3):708-14.

Hughes, B.O., 1976. Behaviour as index of welfare. pp. 1005-1018 in *Proc. 5th Eur. Poultry Conf.* Malta.

Hughes, B.O., Duncan, I.H.J., 1988. Behavioural needs: can be explained in terms of motivational models? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 20: 352-355.

Hurnik, J.F., 1987. Sexual behaviour of female domestic mammals, in the Veterinary Clinics of North America, 3, 2 Farm Animal Behaviour (ed. E.O. Price, Saunders, Philadelphia, 423-461.

INRA. 1988. Alimentation des bovines, ovins et caprins. INRA, Paris, France.

Itoh, H., Tamura, K., Motoi, Y., Kawawa, F., 1997. Serum Apolipoprotein B-100 Concentrations in Healthy and Diseases Cattle. Journal of Veterinary Medical Science Vol. 59, N. 7; pp. 578-591.

Jensen, A. L., 1992. Serum fructosamine in canine diabetes mellitus: An initial study. Veterinary Research Communications 16, 1-9.

Jensen, A.L, & Aaes,H., 1992. Reference interval and critical difference of canine serum fructosamine concentration. Veterinary Research Communications. 16, 317-325.

Jensen, A.L., Petersen MB & House, H., 1993. Determination of fructosamine concentration in bovine serum samples. Journal of Veterinary Medicine, 40: 111-117.

Jensen, A.L., 1995. Glycated blood proteins in canine diabetes mellitus. The Veterinary Record, 137: 401-405.

Jia, L.G., Canny, B.J., Leong, D.A., 1992. Paracrine communication regulates adrenocorticotropin secretion. Endocrinology 130: 534-539.

Johnsen, P.F., Johannesson, T., and Sandøe, P., 2001. Assessment of Farm animal Welfare at herd level: many goals, many methods. Acta. Agric. Scand. Sect. A., Animal Sci. Suppl. 30, 26-33.

Johnson, H.D., Vanjonack, W.J., 1976. Effect of environmental and other stressors on blood hormone patterns in lactating animals. J.Dairy Sci., 59: 1603.

Johnson, R.N., Metcalf, P.A. & Baker, J.R., 1982. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycoprotein. An index of diabetic control. Clinica Chim. Acta 127, 87-95.

Johnson, R.W., 1998. Immune and endocrine regulation of food intake in sick animals. *Domestic Animal Endocrinology*. Vol. 15; Issue: 5; pp. 309-319.

Jones, R.B., 1977. Sex and strain differences in the open field responses of the domestic chick. *Appl. Anim. Etholog.* 3: 255.

Judge, M.D.E., Briskey, J., Meyer, R.K., 1966. Endocrine-related postmortem changes in porcine muscle. *Nature* 212: 287.

Kaneko, I.J., Kawamoto M., Heusner A., Feldman, E.C., Koizumi I., 1992. Relation of fructosamine to serum protein, albumin and glucose concentrations in healthy and diabetic dogs. *Am. J. Vet. Res.* 53: 851-855.

Karen, E., Sheppard, J.L.R., Blum, M., 1990. Differential regulation of Type II corticosteroid receptor messenger ribonucleic acid expression in the rat anterior pituitary and hippocampus. *Endocrinology*, Vol. 127, No. 1, pp. 431-439.

Kawamoto, M.; Kaneko, J.J; Heusner, A.A; Feldman, E.C; Koizumi, I., 1992. Relation of fructosamine to serum protein, albumin, and glucose concentrations in healthy and diabetic dogs. *American Journal of Veterinary Research.* 53 (5): 851-855.

Kelley, K.W., 1980. Stress and immune function: a bibliographic review. *Ann. Rech. Vet.* 11: 445.

Kelly, S., Hertzman, C., Daniels, M., 1997. Searching for the biological pathways between stress and health. *Annu. Rev. Publ. Health* 18: 437-46.

Kenny, L., 1992. Glycation of haemoglobin and serum proteins. In *International Textbook of Diabetes Mellitus*, Eds. K.G.M.M. Alberti, R.A., De Fronzo, H. Keen & P. Zimmet, Chichester, John Wiley and Sons, pp. 983-1007.

Kiss, A., Aguilera G., 1993. Regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress: responses to repeated intraperitoneal hypertonic saline injection. *Brain Res.* 630: 262-270.

Klasing, K.C., 1985. Influence of stress on protein metabolism. In *Animal Stress*, editor Moberg G.P. American Physiological Society, Bethesda, pp. 269-280.

Kosti, O., Raven, P.W., Renshaw, D., Hinson, J.P., 2006. Intra-adrenal mechanism in the response to chronic stress: investigation in a rat model of emotionality. *J. Endocrinol.* 189: 211-218.

Lacetera, N., Bernabucci, B., Scalia, D., Basificò, L., Morera, P., Tardone A., 2006. Heat stress elicits different responses in peripheral blood mononuclear cells from brown swiss and holstein cows. *J. Dairy Sci.* 89: 4606-4612.

Ladewig, J., Smidt, D., 1989. Behavior, episodic secretion of cortisol, and adrenocortical reactivity in bulls subjected to tethering. *Horm. Behav.* 23: 344-360.

Ladewig, J., 2000. Chronic intermittent stress: a model for the study of long term stressors. In G.P. Moberg and J.A. Mench (eds.). *The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare.* CABI Publishing, New York, NY, USA, pp. 159-169.

Lay Jr., D.C., Wilson, M.E., 2004. Considerations when using physiological data in assessing animal well being. *J. Anim. Vet. Adv.* 3: 614-626.

Lazarus, R.S., 1966. *Psychological stress and the coping process.* McGraw-Hill, NY.

Lennard, T.W.J., e Browell D.A., 1993. The immunological effects of trauma. In *Proceedings of the Nutrition Society*, 52, pp.85-90.

Littell R.C., Henry P.R., Ammerman C.B., 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Dairy Sci.* (67): 1216-1231.

Lomborg, S.R., Nielsen, L.R., Heegaard, P.M.H., Jacobsen, S., 2008. Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. *Vet. Res. Commun.* 32: 575-582.

Ludvigsen, J., 1955. Studies on muscle degeneration in pig. Tech. Rep. No. 278. Meat Res. Lab, Copenhagen.

Lund, V., Coleman, G., Gunnarsson, S., Appleby, M.C., Karkinen, K., 2006. Animal science- Working at the interface between the natural and social science. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 97: 37-49.

Luyn, P.G., e Northrop- Clewes, C.A., 1993. Symposium on “Parasitism and protein and energy metabolism in man and animals”, in *Proceedings of the Nutrition Society.* 52, pp.101-111.

Malik, M; Gill, GV; Pugh, RNH; Bakir, A; Hossain, M., 2000. Can plasma fructosamine substitute for glycated haemoglobin (HbA(1c)) estimation in the assessment of diabetic control? *Tropical Doctor*, 30 (2): 74-76.

Main, D.C.J., Kent, J.P., Wemesfelder, F., Ofner, E., and Tuytens, F.A.M., 2003. Applications for methods of on farm-animal welfare assessment. *Animal Welfare* 12: 523-528.

Manteca, X., 1998. Neurophysiology and assessment of welfare. *Meat Sci.* 49 (suppl.1): S205-S218.

Marca, M.C., Loste, A., 2000. Glycosilated haemoglobin assay in blood canine samples. *J. Small Anim. Pract.* 41: 189-192.

Marple, D.N., Aberle, E.D., Forrest, J.C., Blake W.H., Judge, M.D., 1972. Endocrine responses of stress susceptible and stress resistant swine to environmental stressors. *J. Anim. Sci.* 33: 576.

Mason, J.W., 1975. A historical view of the stress field. *J. Hum. Stress* Vol.1: pp. 6-12 e pp. 22-36.

Mason, G.J., 1991. Stereotypies and suffering. *Behavioural Process.* Vol. 25, Issue: 2-3, pp. 103-115.

Mattheews, D.R.G., Kanekco, J.I., Loy, R.G., Cornelius, C.E. & Wheat, J.D., 1966. Compartmentalization and turnover of ¹³¹I-labelled albumin on gamma globulins in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 27: 699-705.

Mayer, E.A., 2000. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut* 47: 861-869.

McDowell, I. & Newell, C., 1987. *Measuring Health A Guide to rating scales and questionnaires*. Oxford University Press, Oxford, UK, p. 342

Mc Ewen, B.S., 1998. Protective and damaging effects of stress mediators. *New. Engl. J. Med.* 338: 171-179.

McFarland, D.F., 2003. Freestall design. Cow recommended refinements. pp 131-138 in *Proc. 5th Int. Conf. on Dairy Housing*, Fort Worth, TX, USA.

Mears, G.C., Brown, F.A., 1997. Cortisol and endorphin responses to physical and psychological stressors in lambs. *Canadian J. Anim. Sci.* 689-694.

Meerwald, R., Links, T., Zeebregts, C., Tio., R., Hillebrands, L., Smit, A., 2008. The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. *Cardiovascular Diabetology*, pp. 7-29.

Mein, G.A., Neijenhuis, F., Morgan, W.F., Reinemann, D.J., Hillerton, J.E., Baines, J.R., Ohnstad, I., Rasmussen, M.D., Timms, L., Britt, J.S., Farnsworth, R., Cook, N., Hemling, T., 2001. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1. Non-infectious factors. pp 347-351 in *Proc. 2nd Int. Symp. on Mastitis and Milk quality*, Vancouver, Canada.

Mendoza, S.P., Capitano, J.P., Mason, W.A. 2000. Chronic Social Stress: Studies in Non-human Primates. In: G.P. Moberg and J.A. Mench (eds.). *The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare*. CABI Publishing, New York, NY, USA, pp. 227-247.

Milman, S.T., Duncan, I.J.H., Stauffacher, M., Stookey, J.M., 2004. The impact of applied ethologists and the International Society for Applied Ethology in improving animal welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86:299-311.

Misciagna, G; Logroscino, G; De Michele, G; Cisternino, AM; Guerra, V; Freudenheim, JL., 2004. Fructosamine, glycated hemoglobin, and dietary carbohydrates. *Clinica Chimica Acta*, 340 (1-2): 139-147.

Moberg, G.P., Anderson C.O., Underwood T.R., 1980. Ontogeny of the adrenal and behavioural responses of lambs to emotional stress. *J. Anim. Sci.* 51: 138.

Moberg, G.P., 1985. Biological response to stress: key to assessment of animal well-being? In animal stress (G.P. Moberg, ed), p. 24-29. American Physiological Society, Bethesda, MD.

Moberg, G.P., Mench, J.A., 2000. *Biology of Animal Stress: Implications for Animal Welfare*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

Morley, J., Hanson, J.M. e Rumjanek, V.M., 1989. Lymphokines, in *Textbook of Immunopharmacology*, 2nd edition by Dale M.M. and Foreman J.C., Oxford, Blackwell Scientific Publication, pp. 168-180.

Morméde, P., Dantzer, R., 1988. La réponse non spécifique de l'organisme aux agressions: du stress à la psychobiologie de l'adaptation. *Recl. Med. Vét.* 164: 707-714.

Morton, D.B., Burghardt, G., Smith, J.A., 1990. Critical Anthroporphism, Animal Suffering and ecological context. *Hasting's Center Report Spring Issue on Animals. Ethics. Sci. Med.* 20 (3): 13-19.

Möstl, E., Palme, R., 2002. Hormones as indicator of stress. *Domest. Anim. Endocrin.* 23: 67-74.

Morrow, C.J., Klover, E.S., Verkerk, G.A., Mathews, L.R., 2002. Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. *Gen. Comp. Endocr.* 126: 229-241.

Mundie, T.G., Januszkiewicz A.J., Rayburn D.B., Martin D.G., e Ripple, E.J., 1981. Effects of conditioning and maximal incremental exercise on oxygen consumption in sheep. *Anim. J. Vet. Res.* 52: 1019.

Munksagaard, L., Simonsen, H.B., 1996. Behavioural and pituitary-adrenal axis responses of dairy cows to social isolation and deprivation of lying down. *J. Anim. Sci.* 74: 769-778.

Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.*, 168: 28-40.

Napolitano, F., Marino V., De Rosa, G., Capparelli, R., Bordi, A., 1995. Influence of artificial rearing on behavioural and immune response of lambs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 45: 245-253.

National Research Council. 2001. Requirements of Dairy Cattle. Seventh Revised Edition, 2001.

Negrão, J.A., Porcionato, M.A., de Passillè, A.M., Rushen, J. 2004. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. *J. Dairy Sci.* 87: 1713-1718.

Nemi, C.J. 1993. Essentials of veterinary hematology. Lea and Febiger ed., Philadelphia, New York, USA.

Neijenhuis, F., Barkema, H.W., Hogeveen, H., Noordhuizen, J.P.T.M., 2000. Classification and longitudinal examination of callused teat ends in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:2795-2804.

National Research Council. 2001. Requirements of Dairy Cattle. Seventh Revised Edition.

Ndibualonji BB., Dehareng D., Van Eenaeme C., Godeau JM. 1995. Response of milk yield, plasma cortisol, amino acids, urea and glucose to a single low-dose administration of adrenocorticotrophic hormone in lactating cows. *Vet. Res.* 26:32-42.

Noordhuizen, J.P., Frankena, K., 1994. Salmonella enteritidis-clinica epidemiologically approaches for prevention and control of salmonella enteritidis in poultry production. *International Journal of food microbiology.* Volume: 21, Issue: 1-2; pp. 131-143.

Oppel, K., Temesvary, K., 2001. Metabolism of glycated proteins in the rabbit. 1. Glycated hemoglobin and blood plasma glucose levels during some weeks after a single blood taking. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 123 (4): 223-237.

Osawa, T., Nakao, T., Moriyoshi, M., Nakada, K., 2000. Effects of dystocia, retained placenta and body condition on plasma b-endorphin profile in periparturient dairy cows. *J. Reprod. Develop.* 46:23-30.

Piñeiro, M., Piñeiro, C., Carpintero, R., Morales, J., Campell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J.M., Lampreave, F., 2007. Characterization of the pig acute phase protein response to road transport. *Vet. J.* 173: 669-674.

Plotsky, P.M., Sawchenko P.E., 1987. Hypophyseal portal plasma levels, median eminence content and immunoistochemical staining of corticotrophin releasing factor, arginine vasopressin and oxytocin after pharmacological adrenalectomy. *Endocrinology* 120: 1361-1369.

Pollok, J.M., Rowan, T.G., Dixon, J.B., Carter S.D., Fallon, R., 1992. Effects of weaning on antibody responses in young calves. *Vet. Immunol. Immunopath.* 33: 25-36.

Puppione, D.L., 1978. Serum lipoproteins in 2 species of phocids (*Phoca Vitulina* and *mirounga angustirostris*) during alimentary lipemia. *Comparative Biochemistry and physiology A-physiology*, 59 (2): 127-132.

Price, E.O., 1984. Behavioural aspects of animal domestication. *Q. Rev. Biol.* 59: 1-32.

Redbo, I., Emanuelsson, M., Lunderberg, K. and Oredsson, N. 1996. Feeding level and oral stereotypies in dairy cows. *Anim. Sci.* Vol. 62, pp. 199-206.

Reusch, C.E., Liehs, M.R., Hoyer, M. & Vochezer, R., 1993. Fructosamine. A new parameter for diagnosis and metabolic control in diabetic dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7: 177-182.

Reusch, C.E., Haberer, B., 2001. Evaluation of fructosamine in dogs and cats with hypo or hyperproteinemia, azoatemia, hyperlipidemia and hyperbilirubinemia. *Veterinary Record*, 148: (12) 370-376.

Rhynes, W.E., Ewing, L.L., 1973. Plasma corticosteroids in Hereford bulls exposed to high ambient temperature. *J. Anim. Sci.* 36: 369.

Riondato, F., D'angelo, A., Miniscalco, B., Bellino, C., Guglielmino, H., 2008. Effects of road transportation on lymphocyte subsets in calves. *Vet. J.* 175: 364-368.

Roche, J.F., Mackey, D., Diskin, M.D., 2000. Reproductive management of postpartum cows. *Animal Reproduction Science.* Vol. 60, pp. 703-712.

Romagnoli, S., 1994. Stress e fertilità. *Manuale di tireogeneologia bovina.* Edagricole, 345-373.

Romero, L.M., 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biochemical research. *Trends Ecol. Evol.* 19: 249-255.

Ropstad, E., 1987. Serum fructosamine levels in dairy cows related to metabolic status in early lactation. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 28: 291-298.

Rousing, T., Bonde, M., Sørensen, T., 2001. Aggregating welfare indicators into an operational welfare assessment system: a bottom-up approach. *Acta Agr. Scand. A-AN 30 (Suppl.):* 53-57.

Rushen, J., Passillé, A.M.d, 1992. The scientific assessment of the impact of housing on animal welfare: a critical review. *Can. J. Anim. Sci.* 72: 721-743.

Rushen, J, de Passillé, A.M.B., 1998. Behaviour, welfare and productivity of dairy cattle. *Canad. J. Anim. Sci.* 78 (Suppl.):3-21.

Rushen, J., Passillé, A.M.d, Keyserlingk M.A.G.V., Weary, D.M., 2007. *The welfare of cattle.* Series: Animal welfare. Springer Ed. Vol. 5, Amsterdam, The Netherlands.

Sacks, D.B., Bruns, D.E., Goldstein, D.E., 2002. Guidelines and recommendations for laboratory analysis and management of diabetes mellitus. *Clin. Chem.*; 48: 436-472.

Saint Pierre, N.R., and Harvey, W.R., 1986. Incorporation of uncertainty in composition of feeds into least-cost ration models. 1. Single chance constrained programming. *J. Dairy Sci.* Vol. 69, n. 12; pp. 3051-3062.

Salak-Johnson, J.L., McGlone, J.J., 2007. Making sense of apparently data: stress and immunity in swine and cattle. *J. Anim. Sci.* 85 (Suppl. E): E81-E88.

Sandøe, P., Christiansen, S.B., Appleby, M.C., Webster, A.J.F., Main, D.C.J., 2003. Farm animal welfare: the interaction of ethical questions and animal welfare science. *Anim. Welfare* 12:469-478.

Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21: 55-89.

Scientific Committee of Animal Health and Animal Welfare, 2001. The welfare of cattle kept for beef production. Report no. SANCO.C.2. /AH/ R22/2000. Home page address: [http\\ec.europa.eu.food](http://ec.europa.eu.food).

Scott, M.E., Nolan, A.M., Fitzpatrick, J.L., 2001. Conceptual and methodological issues related to welfare assessment: a framework for measurement. *Acta Agric. Scand. A* 30 (Suppl.):5-10.

Seeling, M.S., 1994. Consequences of magnesium deficiency on the enhancement of stress reactions; preventive and therapeutic implications. *J. Anim. Coll. Nutr.* 13: 429-446.

Selye, H., 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32.

Selye, H., 1950. *Physiology and Pathology of exposure to stress*. Montreal, Canada, Acta.

Selye, H., 1973. The evolution of stress concept. *Amer. Scient.* 61: 692-699.

Selvaraj, N., Bobby A, Kumar Das, A., Ramesh R., Chandra Koner, B., 2002. An evaluation of level of oxidative stress and protein glycation in nondiabetic undialyzed chronic renal failure patients. *Clinica Chimica Acta* 324, pp. 45-50.

Shah, U., Walker W.A., 2000. Adverse host responses to bacterial toxins in human infants. *J.Nutr.* 130:420S-425S.

Sheridan, J.F., Dobbs, C., Brown, D., Zwillig, B., 1994. Psychoneuroimmunology: stress effects on pathogenesis and immunity during infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 200-212.

Shutt, D.A., Fell, L.R., 1985. Comparison of total and free cortisol in bovine serum and milk or colostrum. *J. Dairy Sci.* 68: 1832-1834.

Siegel, H.S., 1987. Effects of behavioral and physical stressors on immune responses. In Wiepkema, P.R., e Van Adrichem, P.W.M.; *Biology of stress in farm animals: an integrative approach*. Martinus Nijhoff Publishers, England. 39-54.

Simonsen, H.B., 1996. Assessment of animal welfare by a holistic approach: behaviour, health and measured opinion. *Acta Agriculturae Scandinavica section A- Animal Science*, pp. 91-96.

Skidmore, A.L., Peeters, K.A.M., Sniffen, C.J., Brand, A., 1996. Monitoring dry period management. In: A. Brand, J.P.T.M. Noordhuizen and Y.H. Schukken (eds.) *Herd health and production management in dairy practice*. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands, pp 171-201.

Skinner, B.F., 1938. *The behaviour of Organisms: An experimental Analysis*. Appleton-Century-Crofts, New York, NY, USA.

Smith, R.F., Dobson, H., 2002. Hormonal interactions within the hypothalamus and pituitary with respect to stress and reproduction in sheep. *Domest. Anim. Endocrin.* 23: 75-85.

Sorondo, M.L., Cirio, A., 2009. Evaluation of the serum fructosamine test to monitor plasma glucose concentration in the transition dairy cows. *J. Dairy. Res.* 76: 173-178.

Sørensen, J.T., Sandøe, P., Halberg, H., 2001. Animal welfare as one among several values to be considered at farm level: the idea of an ethical account for livestock farming. *Acta Agr. Scand. ANN 30 (Suppl.):* 11-17.

Sprecher, D.J., Hostetler, D.E., Kaneene, J.B., 1997. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology* 47:1179-1187.

Stengärde, L., Traven, M., Emanuelson, Ufl., Holtenius, K., Hultgren, J., Niskanen, R., 2008. Metabolic profiles in five high-producing Swedish dairy herds with a history of abomasal displacement and ketosis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50: pp. 1-11.

Stolba, A., Woodgush, D.G.M., 1984. The identification of behavioural key features and their incorporation into a housing design for pigs. *Annals De Recherches Veterinaires*. Vol. 15; Issue: 2, pp. 287-298.

Sundarm, R.C; Selvaraj, N; Vijayan, G; Bobby, Z; Hamide, A; Dasse, N.R., 2007. Increased plasma malondialdehyde and fructosamine in iron deficiency anemia: Effect of treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61 (10): 682-685.

Sundrum, A., Rubelowski, I., 2001. The meaningfulness of design criteria in relation to the mortality of fattening bulls. *Acta Agric. Scand. Sect. A Animal Sci.Suppl.* 30, 48-52.

Tachè, Y., Martinez, V., Milion, M., Rivier, J., 1999. Corticotropin-releasing factor and the brain gut motor response to stress. *Can. J. Gastroenterol.* 13 (Suppl. A): 18-25.

Tahara, Y., Shima, K., 1995. Kinetics of HbA_{1c}, glycated albumin and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose levels. *Diabetes Care* 18: 440-447.

Tahatcher, W.W., Collier, R.J., 1986. Effects of climate on bovine reproduction. In *Current therapy in theriogenology*. Eds. : Morrow Sanders, 301-309.

Thun R, Eggenberger E., 1996. Relationship between cortisol and testosterone during resting conditions, after acute stress and hormone stimulation in steers. *Schweiz Arch Tierheilkd*;138(5):225-33.

Thrusfield, M., 1995. *Veterinary Epidemiology*. Blackwell Science Ltd. Oxford, Great Britain, pp. 479.

Tinbergen, N., 1951. *The study of Instinct*. Clarendon Press Oxford, UK.

Toates, F., 1986. *Motivational Systems*. Cambridge Univ.Press, Cambridge, UK.

Trevisi, E., Calamari, L., Bertoni, G., Cappa, V., 1992. The possible relationship between oxytocin release and blood potassium in stress phenomena in ruminants. Page 364. In *Proc. 8th Int. Conf. on production diseases in farm animals*, Berne, Switzerland.

Trevisi E., Calamari L., Bertoni G., 2001. Definition of a liver activity index in the puerperium and fertility in dairy cows. Proc. 52th Annual Meeting of EAAP (European Association for Animal Production), Budapest, Hungary, 26-29 August 2001, Ed. Y. Van der Honing, Wageningen Pers.(7):189.

Trevisi, E., Archetti, A., Ferrari, A., Bertoni G., 2003. High milk yield levels in the intensive dairy farms does not necessarily impair the cow welfare. pp. 143-147 in Proc. 4th Eur. Congr. EUROSAFE (European Society for Agricultural and Food Ethics), Toulouse, France.

Trevisi, E., Lombardelli, R., Bionaz, M., Bertoni, G., 2005. Plasma cortisol level in relationship to welfare conditions in dairy cows. Proc. 56th Ann. Meet.EEAP, Uppsala, Sweden, 11: 106 (abstr.).

Trevisi, E., Bionaz, M., Piccioli-Cappelli, F., Bertoni, G., 2006. The management of intensive dairy farms can be improved for better welfare and milk yield. *Livest. Sci.* 103: 231-236.

Trevisi, E., Lombardelli, R., Minuti, A., Bertoni, G., 2007. Change of digesta passage rate in dairy cows after different acute stress situations. *Ital. J. Anim. Sci.* 6 (Suppl.1): 377-379.

Trevisi, E., Bertoni, G. 2009. Chronic stress evaluation in cattle. *Ital. J. Anim. Sci.* vol. 8 (suppl.1), 265-286.

Tuchscherer, M., Puppe, B., Tuchscherer, A., Kanitz, E., 1998. Effects of social status after mixing on immune, metabolic, and endocrine responses in pigs. *Physiol. Behav.* 64:353-360.

Vallet, A., 1996. Evaluation de l'état sanitaire de troupeaux laitiers par une note globale. *Rev. Med. Vet.* 172, 676-684 In French.

Vannemuheler, M.J., 1995. Role of cytokines in intestinal health and disease. In "Cytokines in animal health and disease", edited by M.J. Myers and M.P. Murthaugh, Marcel Dekker Inc. 333-355.

Vanjonack, W.J., Johnson, H.D., 1975. Effect of heat and milk yield on bovine plasma glucocorticoid levels. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148: 970.

Vazhapilly, P., Calamari, L., Frazzi, E., Azzoni, A., Cappa, V., 1992. Effect of heat stress on cheesemaking quality of milk from dairy cows raised in Po valley. pp 19-28 in Proc. 2nd Int. Sem. CIGR (International Commission of Rural Engineers) on Environmental and energy aspects of livestock housing, Polanica, Poland.

Veissier, I., Sarignac, C., Capdeville, J., 1999. Methods of assessing the welfare of domestic animals. *Prod. Anim.* 12:113-121.

Veissier, I., Boissy, A., Capdeville, J., Sarignac, C., 2000. Le bien être des animaux d'élevage comment peut-on le définir et l'évaluer? *Le point vétérinaire.* 31 (205), 25-32.

Veissier, I., Capdeville, J., Delval, E., 2004. Cubicle housing systems for cattle: Comfort of dairy cows depends on cubicle adjustment. *J. Dairy Sci.* 82:3321-3337.

Verga, M., Canali, E., Ferrante, V., Mattiello, S., Monti, F., Gottardo, F., Cozzi, G., 2000. Provision of solid supplement to veal calves reared in individual crate or group pen. 2. Behavioural, physiological and pathological indicators. *Zoot.Nutr. Anim.* 26: 243-252.

Verkerk, G.A., Macmillan, K.L., McLeay, L.M., 1994. Adrenal cortex response to adrenocorticotrophic hormone in dairy cattle. *Domest. Anim. Endocrin.* 11: 115-123.

Verkerk, G.A., Phipps, A.M., Carragher, J.F., Matthews, L.R., Stelwagen, K., 1998. Characterization of milk cortisol concentration as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. *Anim. Welfare* 7: 77-86.

Von Borell, E.H., 2001. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. *J. Anim. Sci.* 79 (E. Suppl.): E260-E267.

von Borell, E., Langbein, J., Després, G., Prunier, A., Valance, D., Veissier, I., 2007. Heart rate variability as a measure of automatic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals.- A review. *Physiol. Behav.* 92: 293-316.

Wahid, S.T., Sultan, J., Handley, G., Saeed, B.O., Weaver, J.U., Robinson C.J., 2002. Serum fructosamine as a marker of 5-years risk of developing diabetes mellitus in patients exhibiting stress hyperglycaemia. *Diabetic Medicine*, 19: 543-548. Diabetes, UK.

Waiblinger, S., Knierim, U., Winckler, C., 2001. The development of an epidemiologically based on farm welfare assessment system for use with dairy cows. *Acta Agric. Scand. Sect. A. Animal Sci.* 2001: Suppl. 30, 73-77.

Watson, J.B., 1928. *Behaviorism*. Routledge and Keegan Paul, London UK.

Webster, A.J.F., 1983. Environmental stress and the physiology, performance and health of ruminants. *J. Anim. Sci.* 57: 1584-1593.

Webster, J., 1994., *Animal Welfare- A cool eye towards eden*. Blackwell Science, Oxford, UK.

Webster J. (1997). Applied ethology: what use is it to animal welfare?. *Advances in Ethology*. Suppl. 32, pp 10.

Wemelsfelder, F., Lawrence, A.B., 2001. Qualitative assessment of animal behaviour as an on-farmwelfare-monitoring tool. *Acta Agric. Scand. A-AN 30 (Suppl.):*21-25.

Weary, D.M., Tazskun, I., 2000. Hock Lesions and Free-Stall Design. *J. Dairy Sci.* 83:697-702.

Weber, R.E.F., Zarate, A.V., 2005. Welfare in farm animal husbandry –current definitions and concepts as basis for practical oriented research with focus on fattening pig husbandry. *Arch. Tierzucht.* 48: 475-489.

Webster, J., 2006. Animal sentience and animal welfare: What is it to them and what is it to us? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 100. 1-3.

Weiss, D., Helmreich, S., Möstl, E., Dzidic, A., Bruckmaier, R.M., 2004. Coping capacity of dairy cows during the change from conventional to automatic milking. *J. Anim. Sci.* 82: 563-570.

WHO, 1946. Preamble to the Constitution of the World Health Organization as adopted by the International Health Conference, New York, June 19-22, 1946. Official Records of the World Health Organization, no. 2.

Wiepkema, P.R., 1987. Behavioural aspects of stress. In: P.R. Wiepkema and P.W.M. Van Adrichem (eds.) *Biology of Stress in Farm Animals: An Integrative Approach*. Martinus Nijhoff, The Netherlands, pp. 113-133.

Willms, B., and Lehmann, P., 1990. A new fructosamine test as a routine parameter in diabetes monitoring. *Wiener Klinische Wochenschrift Supplementum* 180, 102, 5-10.

Winckler, C., 2006. On farm welfare assessment in cattle from basic concepts to feasible assessment systems. *World Buiatric Congress 2006*. Nice, France- p. 493.

Wood-Gush, D.G.M., Duncan, I.J.H., Fraser, D., 1975. Social stress and welfare problems in agricultural animals. In: E.S.E. Hafez (ed.) *The Behaviour of Domestic Animals*. Tindall and Cassell, London, UK, pp 182-200.

Woo, J., Cockram, C., Lau, E., Chan, A., Swaminathan, R., 1992. Influence of obesity on plasma fructosamine concentration. *Clin. Chem.*, 38 (11): 2190-2192.

RINGRAZIAMENTI

Eccomi qui davanti alla parte che forse è la più complicata del “lavoro”, ma anche la più bella.....

Ringrazio il Prof. Calamari, per la sua infinita disponibilità, per la sua collaborazione e per i suoi preziosi consigli che ha saputo darmi sia durante questo triennio che durante la scrittura della tesi; il Prof. Bertoni per le sue lezioni, per avermi donato un po' della sua infinita conoscenza, perché oltre ad avermi dimostrato infinita disponibilità ha saputo darmi dei preziosi insegnamenti di vita ed il Dott. Trevisi per il contributo ed i consigli dati durante tutti gli anni del dottorato e durante la realizzazione della tesi finale.

Non posso dimenticare colei che mi consigliò ben più di tre anni fa ormai, di provare a fare la domanda per partecipare al concorso per accedere a questo dottorato, la Prof.ssa Emilia Duranti dell'Università degli Studi di Perugia, e la ringrazio con affetto perché alla fine di questi tre anni posso dire di essere veramente contenta di questo percorso che ho intrapreso e portato a termine nonostante tutte le difficoltà incontrate, e che questo dottorato mi ha dato una grande opportunità di crescita professionale; oltre a lei credo che sia giusto dire “grazie” anche ai Prof. Panella e Prof.ssa Sarti perché hanno creduto in me e spronato a non mollare ancor prima di cominciare questa “avventura” e per avermi detto quando comunicai loro di aver vinto il concorso: “vai Sara, accetta e non ci pensare due volte perché questo treno non ti ricapiterà una seconda volta”.

Un immenso grazie ai miei genitori perché anche questa volta sono arrivati fino alla fine insieme a me. Non riesco a trovare le parole più adatte che possano esprimervi tutta la mia gratitudine che sento nei vostri riguardi per tutto quello che sempre fate per me, per i vostri sacrifici, per i vostri insegnamenti, per il vostro affetto.

Ora è il momento dell'IZ.....ebbene si, non potevate non esserci perché anche voi avete dato un contributo notevole alla realizzazione di questa “creatura”.....Vi ringrazio per la vostra comprensione (ammetto di non essere sempre stata un gioiellino), per avermi sostenuto e spronato a non mollare anche quando i nervi erano all'ennesima potenza e voi capite bene a cosa mi riferisco, per avermi fatto ridere, per avermi consolato, per aver accolto i miei sfoghi e a volte anche le mie lacrime, per essere venuti sempre in mio soccorso (dalle consulenze linguistiche, a quelle informatiche e devo dire anche meccaniche, poiché la mia macchina non sempre ha fatto il suo dovere), per essere la mia seconda famiglia e per avermi regalato giorno dopo giorno a modo vostro tanto affetto.

Alex, ti ringrazio perché sei arrivato in uno dei momenti per me più importanti dimostrandomi incoraggiamento, affetto e comprensione pur conoscendomi da così poco tempo.

Ci sono altre due persone che hanno avuto un ruolo importante in questa “avventura” che ovviamente non posso non ringraziare, i mitici Dott. Battaglia e la Dott.ssa Filice, o meglio il mio Avvocato, compagni insostituibili di lavoro (anche se proveniamo da corsi di laurea completamente diversi), consiglieri fidati, guide insostituibili per questo cammino, compagni di risate, e amici su cui contare anche quando non si starà più tra le mura della Cattolica.

Alessandra, grazie perché sei stata una delle persone che ha capito maggiormente quello che durante questi tre anni mi ha circondato, che hai saputo sapientemente consigliarmi e sulle cui esperienze ho potuto imparare e trovare il modo per andare avanti.

Antonio amico insostituibile, grazie per esserci sempre.

Gli amici lontani perché con il loro supporto mi fanno sentire di esserci sempre anche quando magari non ci sente per mesi.

Tutto il gruppo di amici della palestra Acrobatic perché è anche grazie a voi che sono riuscita ad arrivare alla fine di questi tre anni; perché il tempo trascorso in vostra compagnia e in quell'ambiente mi ha permesso di stemperare tutte le tensioni accumulate e come dicevano i latini: “mens sana in corpore sano”.