

## PARAMETRI EMATICI COME POSSIBILI INDICATORI DI BENESSERE IN BOVINE DA LATTE

### BLOOD PARAMETERS: POTENTIAL WELFARE INDICATORS IN DAIRY COWS

LORELLA GIULIOTTI <sup>(1)</sup>, JACOPO GORACCI <sup>(2)</sup>,  
MARIA NOVELLA BENVENUTI <sup>(1)</sup>, ILARIA FACDOUELLE <sup>(3)</sup>,  
ALBERTO PROFUMO <sup>(4)</sup>

#### RIASSUNTO

La stretta relazione tra andamento dei parametri ematici e fase fisiologica in molte specie animali per i diversi indirizzi produttivi (vacche da latte, vitelli da ingrasso e suinetti) ha spinto da anni la ricerca ad indagare su tale legame, reso ancora più complesso da fattori di carattere fisiologico, alimentare e manageriale.

L'intento di questo lavoro è apportare un contributo a tale argomento, finalizzando l'interpretazione di alcuni dei parametri ematici analizzati alla valutazione dello stato di benessere delle lattifere. Sono stati effettuati quattro prelievi ematici stagionali (estate 2001, autunno 2001, inverno 2001/2002 e primavera 2002) su 54 bovine da latte di razza Frisona. Lo stato fisiologico (asciutta, transizione, fresche, lattazione e tarda lattazione) ha influenzato le concentrazioni di ALT ( $p<0.05$ ), azoto ureico ( $p<0.001$ ), glucosio ( $p<0.05$ ), proteine totali ( $p<0.05$ ), creatinina ( $p<0.001$ ), colesterolo ( $p<0.001$ ), trigliceridi ( $p<0.001$ ) e globuli bianchi ( $p<0.05$ ). I valori maggiormente alterati sono stati registrati per AST (64.2% dei campioni), colesterolo (84.7%), trigliceridi (80.6%), NEFA (44.9%), albumine (69.4%), ematocrito (78.6%), ed alcune componenti della formula leucocitaria. Ciò segnala una generale alterazione di importanti indicatori metabolici, anche in assenza di cali produttivi evidenti. Tali informazioni possono fornire nelle vacche da latte utili indicazioni per un monitoraggio mirato, identificando le fasi produttive più critiche (*transition cow* e i primi 100 gg di lattazione) ed apportando di conseguenza opportune strategie per migliorare le condizioni di vita degli animali in allevamento.

Parole chiave: lattifere, Frisona, parametri ematici chimico-clinici, benessere.

#### SUMMARY

For years, blood parameters have been used as a tool for evaluating animal welfare on farms, appearing to be closely connected to physiological status in dairy cows, calves and

<sup>(1)</sup> Dipartimento di Produzioni Animali, Direttore Prof. Paolo Verità.

<sup>(2)</sup> Dottorando in Produzioni Animali, Sanità ed Igiene degli Alimenti nei Paesi a Clima Mediterraneo, Anno 2004.

<sup>(3)</sup> Titolare di assegno di Ricerca, Dipartimento di Produzioni Animali, Direttore Prof. Paolo Verità.

<sup>(4)</sup> Collaboratore Esterno.

Ricerca effettuata con fondi Ateneo 2003.

piglets. The aim of this work was to evaluate blood parameters in 54 Friesian dairy cows, highlighting their welfare conditions. Samples were collected four times (summer 2001, autumn 2001, winter 2001/2002 and spring 2002). Results were discussed regarding the main physiological phases (dry period, transition, fresh lactating, mid-lactating and late lactating periods). These periods significantly influenced AST ( $p < 0.05$ ), urea ( $p < 0.001$ ), glucose ( $p < 0.05$ ), total protein ( $p < 0.05$ ), creatinine ( $p < 0.001$ ), cholesterol ( $p < 0.001$ ), triglycerides ( $p < 0.001$ ) and white blood cells ( $p < 0.05$ ) concentrations. AST (64.2% of samples), cholesterol (84.7%), triglycerides (80.6%), NEFA (44.9%), albumin (69.4%) and packed cell volume (78.6%) were the most altered blood parameters. In this context, many values were not included in the physiological range, even if no drop in production was noticed. Our results could give primary indications for the state of dairy cows welfare, indicating targeted parameters (AST, cholesterol, triglycerides, NEFA, albumin, packed cell volume and neutrophil/lymphocytes ratio) and critical phases (transition and early lactation periods) to simplify animal control and implement appropriate corrective measures aimed at improving living conditions on farms.

Key words: dairy cow, Friesian, biochemical haematic parameter, welfare.

## INTRODUZIONE

La valutazione oggettiva del benessere animale appare ancor oggi un argomento molto discusso e controverso, data l'effettiva difficoltà nell'individuazione di pochi indici dal significato generale e, per quanto possibile sensibili e poco costosi, che possano "riassumere" le condizioni generali degli animali in allevamento. Problematica sembra, inoltre, la distinzione tra risposte a stress acuti e a stress cronici (o meglio ad una successione di ripetuti stress acuti): proprio in quest'ultimo caso, infatti, può avvenire un calo delle reazioni degli animali a causa della "familiarità" con lo stressore, oppure una loro accentuazione, per una sorta di sensibilizzazione che può scatenare risposte abnormi (Ladewig, 2000). A tutto ciò si somma il fatto che molti parametri sono determinabili solamente con analisi dai costi piuttosto elevati o con campionamenti che implicano essi stessi uno stress acuto, minando l'attendibilità del risultato (Bertoni, 2002).

In quest'ottica, è logico dedurre che un numero ristretto di indici non può fornire un'idea esaustiva delle condizioni degli animali (Veissier e coll., 2000), pertanto sarebbe opportuno tener conto contemporaneamente di vari ordini di parametri (Bono, 2001): comportamentali, fisiologici, produttivi e sanitari.

Alcuni Autori ritengono, comunque, che i parametri ematici, sia per quanto riguarda l'esame emocromocitometrico e la formula leucocitaria (Archetti & Ravarotto, 2002), che per il profilo metabolico (Bertolin e coll., 2002), possano essere impiegati come validi indicatori di alterazioni a livello fisiologico direttamente collegate ad una condizione di stress dell'animale. In effetti, l'assenza di stress eccessivi è universalmente considerata condizione necessaria e sufficiente per uno stato di benessere (Bertoni, 2000): questo spiega i numerosi studi dei fattori di stress e delle loro conseguenze sull'organismo, dato che sono proprio queste ultime a

portare al *distress* (situazione in cui l'animale non è in grado di adattarsi all'ambiente o alla modificazione degli stimoli esterni). I parametri ematici, inoltre, possono aiutare nell'individuazione del *disease stress*, cioè dello stress collegato ad uno stato patologico: uno stato infiammatorio, infatti, può essere esso stesso causa di minor benessere, accentuando il rischio di malattia nell'animale (Bertoni, 2002).

Questo lavoro prende in esame alcuni parametri chimico-clinici utilizzati come possibili indicatori di benessere in un allevamento di vacche da latte, correlandoli con lo stadio fisiologico degli animali.

## MATERIALI E METODI

Sono stati presi in esame 54 soggetti di razza Frisona allevati in un'azienda di circa 260 vacche da latte, situata nella provincia di Pisa. Le bovine, mantenute in stabulazione libera, venivano alimentate con *unifeed*: la razione, distribuita tre volte al giorno (16 kg/capo), era composta da pastone di mais, insilato polifita, fieno di medica, paglia, mangime composto integrato, mais, orzo, soia, cotone, bicarbonato, zeolite ed acqua. Gli animali venivano separati in base al livello produttivo ed allo stadio fisiologico (lattazione, manze e asciutta).

Sono stati effettuati quattro campionamenti stagionali (estate 2001, autunno 2001, inverno 2001/2002 e primavera 2002), durante i quali è stato prelevato nella mattina un campione di sangue individuale, sul quale sono stati determinati i principali parametri ematochimici presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana: aspartato transaminasi (AST), alanina amino transferasi (ALT), glucosio (GLU), proteine totali (TP), azoto ureico (UN), creatinina (CR), colesterolo (CHO), trigliceridi (TR), acidi grassi non esterificati (NEFA), albumine (AL), globuline (GL), globuli rossi (RBC), globuli bianchi (WBC), emoglobina (HGB), ematocrito (PCV), neutrofili (NEU), eosinofili (EOS), basofili (BAS), linfociti (LYM) e monociti (MONO). È stato preso in esame, inoltre, il rapporto neutrofili/linfociti (N/L), come indicatore di stress causato da infiammazione sistemica (Zahorec, 2001).

I dati raccolti sono stati poi esaminati tenendo conto della fase fisiologica degli animali (Calamari e coll., 2004): "Asciutta", "Transizione" ( $\pm 21$  gg dal parto), "Fresche" (da 21 a 100 gg dal parto), "Lattazione" (da 100 a 200 gg dal parto) e "Tarda lattazione" (>200 gg dal parto).

I dati relativi alla carriera riproduttiva sono stati reperiti grazie alle schede aziendali e presso l'Associazione Provinciale Allevatori di Pisa.

L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software JMP, ver. 5.0 per PC, del SAS Institute (2002). I dati relativi a RBC, WBC, NEU, EOS, BAS, LY e MONO sono stati trasformati logaritmicamente per correggere l'eterogeneità della varianza e per ottenere una distribuzione normale dei dati. È stata effettuata l'analisi della varianza per verificare la presenza di differenze significative tra i parametri ematici all'interno delle fasi fisiologiche.

**Tab. Ia.** Media e deviazione standard dei principali parametri ematici per fase fisiologica. *Mean and standard deviation of several blood parameters, according to the main physiological phases.*

	AST (U/L)	ALT (U/L)	GLU (mg/dl)	TP (g/dl)
Asciutta - <i>Dry period</i>	64.4±13.72	27.4±4.98	50.6±8.26	7.9±0.62
Transizione - <i>Transition</i>	79.9±31.21	24.7±7.70	48.6±8.71	7.1±0.82
Fresche - <i>Fresh lactating</i>	90.7±22.23	34.3±8.53	55.8±8.24	8.0±0.70
Lattazione - <i>Mid lactating</i>	92.8±19.67	36.6±7.31	54.7±10.68	7.9±0.65
Tarda lattazione - <i>Late lactating</i>	101.8±64.49	35.4±8.09	47.2±12.32	7.7±0.69
	UN (mg/dl)	CHO (mg/dl)	TR (mg/dl)	NEFA (μmol/L)
Asciutta - <i>Dry period</i>	14.0±5.10	159.6±40.15	22.4±7.96	406.8±127.03
Transizione - <i>Transition</i>	15.0±4.08	123.4±28.12	13.4±10.91	353.0±264.76
Fresche - <i>Fresh lactating</i>	18.0±3.32	223.0±40.52	9.6±3.98	226.5±177.48
Lattazione - <i>Mid lactating</i>	17.2±4.83	227.5±53.56	11.0±3.81	214.0±144.35

Le caselle in grigio evidenziano valori medi che si discostano dagli attesi. *Grey boxes indicate critical mean values.*

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I parametri ematici (Tab. Ia e Ib) hanno mostrato alterazioni dei valori medi circoscritte ad alcuni parametri (AST, CHO, TR, NEFA, AL, PCV, NEU, MONO), mettendo in risalto, considerata la deviazione standard generalmente alta, anche una forte variabilità individuale. Il raggruppamento dei campioni in base alle diverse fasi fisiologiche ha cercato di interpretare con più precisione tale oscillazione.

L'analisi della varianza ha indicato differenze significative in alcuni parametri ematici tra le varie fasi fisiologiche, confermando l'influenza di questo fattore sullo stato metabolico delle vacche da latte, insieme al livello produttivo, alle condizioni alimentari e manageriali degli animali (Bertoni e coll., 2000).

In accordo con alcuni Autori (Bertoni e coll., 2000; Castillo e coll., 2004), CHO ( $p < 0.0001$ ), CR ( $p = 0.0001$ ), TR ( $p < 0.0001$ ), e TP ( $p = 0.0447$ ) sono risultati

**Tab. Ib.** Media e deviazione standard dei principali parametri ematici per fase fisiologica. *Mean and standard deviation of several blood parameters, according to the main physiological phases.*

	<b>AL (g/dl)</b>	<b>GL (mg/dl)</b>	<b>RBC (10<sup>6</sup>/μl)</b>	<b>WBC (10<sup>3</sup>/μl)</b>
Asciutta - <i>Dry period</i>	3.7±0.57	4.2±0.91	6.8±1.06	8.8±1.42
Transizione - <i>Transition</i>	3.6±0.22	3.6±0.75	5.9±0.28	6.5±2.50
Fresche - <i>Fresh lactating</i>	3.6±0.59	4.3±0.86	6.1±0.76	9.1±2.00
Lattazione - <i>Mid lactating</i>	3.4±0.67	4.4±0.84	6.5±0.84	8.9±2.33
	<b>HGB (g/dl)</b>	<b>PCV (%)</b>	<b>NEU (%)</b>	<b>EOS (%)</b>
Asciutta - <i>Dry period</i>	10.7±1.59	30.4±4.69	36.8±10.57	3.2±3.11
Transizione - <i>Transition</i>	9.5±0.62	26.7±1.35	45.9±11.02	1.9±2.48
Fresche - <i>Fresh lactating</i>	9.6±0.74	26.8±2.29	45.3±10.40	1.4±1.84
Lattazione - <i>Mid lactating</i>	9.9±1.14	27.6±3.47	43.6±9.48	2.3±3.22
	<b>BAS (%)</b>	<b>LYM (%)</b>	<b>MONO (%)</b>	
Asciutta - <i>Dry period</i>	0.0±0.00	60.0±11.07	0.0±0.00	
Transizione - <i>Transition</i>	0.0±0.00	50.6±10.69	0.0±0.00	
Fresche - <i>Fresh lactating</i>	0.0±0.00	53.2±10.80	0.0±0.00	
Lattazione - <i>Mid lactating</i>	0.0±0.00	54.0±10.62	0.0±0.21	

Le caselle in grigio evidenziano valori medi che si discostano dagli attesi. *Grey boxes indicate critical mean values.*

direttamente influenzati dalla fase fisiologica.

In particolare, ad ulteriore conferma di quanto riportato nei due lavori precedentemente citati, il livello di CHO ematico ha mostrato un significativo aumento al progredire della lattazione fino ai 100 gg (123.4 vs 227.5), raggiungendo anche valori al di là di quelli fisiologici (50-150 mg/dl), dopodiché è seguito un leggero calo

(227.5 vs 201.9). Nella specie bovina l'ipercolesterolemia può essere utilizzata come indicatore di lipomobilizzazione (Bertolin e coll., 2002), anche in seguito a fenomeni stressanti. L'elevarsi del cortisolo ematico, ormone spesso impiegato come indicatore di *distress*, determina un incremento della lipolisi: nel nostro caso ben l'84.7% dei campioni presentava un livello di CHO superiore ai 150 mg/dl. Lattifere ad alta produzione, se non correttamente alimentate, possono andare incontro a squilibri metabolici nelle prime fasi della lattazione, causati dal bilancio nutritivo negativo e dai frequenti cambiamenti di *management* (Holtenius e coll., 2004).

A conferma di ciò, anche i NEFA hanno riportato valori superiori a quelli attesi nel 31.6% dei casi, non mostrando, però, differenze significative tra le diverse fasi fisiologiche, come rilevato anche da Castillo e coll. (2004). Alti livelli di NEFA possono essere accompagnati da gravi problemi al sistema immunitario dell'animale (Rukkamsuk e coll., 1999).

TR ha fatto rilevare un andamento altalenante nel tempo, anche se, nell'80.6% dei campionamenti, ha presentato in media valori inferiori a quelli fisiologici (15-45 mg/dl). Nei bovini, comunque, tale parametro risulta strettamente correlato alla categoria produttiva ed alla presenza di grassatura della razione (Bertolin e coll., 2002).

TP e CR hanno valori pressoché costanti durante il periodo preso in esame, ma, mentre tutti i valori di CR riscontrati rientravano nel *range* di riferimento (<1.5 mg/dl), le TP hanno fatto rilevare valori superiori agli 8 g/dl attesi nel 31.6% dei casi, anche se uniformemente distribuiti all'interno delle cinque fasi fisiologiche. Condizioni di iperproteinemia possono essere messe in relazione ad insufficienza epatica o renale, enteropatie o a situazioni di malassorbimento e malnutrizione (Bertolin e coll., 2002).

Le AL hanno fatto rilevare valori in media poco superiori a quelli di riferimento (3.1-3.5 g/dl) in alcune fasi, ma la loro distribuzione disomogenea all'interno delle classi fisiologiche porta a soffermarsi sulla criticità del periodo della *transition cow* (Calamari e coll., 2004): proprio nell'intervallo che abbraccia i 21 gg prima e dopo il parto circa il 73% degli animali ha presentato valori superiori ai 3.5 g/dl. Situazioni di iperalbuminemia possono essere, infatti, ricollegate a stati di disidratazione (Bertolin e coll., 2002). A conferma di ciò, possiamo notare che anche il GLU, risultato significativamente influenzato dalla fase fisiologica ( $p=0.012$ ), nella fase "Transizione" ha fatto rilevare concentrazioni inferiori ai 40 mg/dl attesi nel 29% dei casi, percentuale nettamente superiore a quella di tutti gli altri periodi. Situazioni di ipoglicemia possono derivare da malassorbimento e da sindromi epato-renali (Bertolin e coll., 2002); nei ruminanti, comunque, la quantità di energia della razione ha un ruolo fondamentale nell'insorgenza di forme dismetaboliche, quali acidosi, meteorismo e chetosi.

L'UN è risultato statisticamente influenzato dalla fase fisiologica degli animali ( $p<0.0001$ ), ma nei ruminanti le modificazioni della concentrazione di urea risultano spesso correlate al tipo di dieta somministrata ed in particolar modo al rapporto tra proteina alimentare ed energia (Bertolin e coll., 2002).

L'AST ha presentato un concentrazione crescente nel tempo, superando, nelle fasi "Fresche", "Lattazione" e "Tarda lattazione", gli 80 U/L. La percentuale di animali

con tale parametro alterato è salita dall'asciutta (circa il 20%) al parto (circa il 57%) e da quest'ultimo ai primi 100 gg di lattazione (circa il 78%), per poi scendere con il progredire della lattazione stessa (circa il 59%). Tale parametro viene comunemente utilizzato nella diagnosi delle patologie epatiche e cardiache di diversa origine (Bertolin e coll., 2002).

L'ALT è risultato significativamente influenzato dalla fase fisiologica ( $p=0.0041$ ), superando, solamente nel 3% dei campionamenti, il *range* fisiologico ( $<50$  U/L).

Passando, quindi, alla valutazione dell'esame emocromocitometrico, particolare importanza deve essere attribuita alla formula leucocitaria, al PCV e all'HGB nell'ambito della problematica del benessere animale (Archetti & Ravarotto, 2002).

Il rapporto N/L è risultato mediamente sotto il limite massimo ( $<1$ ) (Calamari e coll., 2004), mostrando un andamento crescente dal parto ai primi 100 gg di lattazione (20% di campioni  $>1$  contro il 32%) e calando successivamente (circa 17%). Le fasi di "Transizione" e "Fresche" risultano caratterizzate da un generale aumento dei neutrofili e calo dei linfociti (circa il 29% dei campioni in entrambe le fasi aveva valori  $<45\%$  atteso).

Non risulta rilevabile lo stato di monocitosi caratteristico delle bovine da latte (Archetti & Ravarotto, 2002): ciò può indicare la mancanza di stati infiammatori cronici nell'allevamento in questione.

L'HGB ha ottenuto sempre valori superiori ai 7.3 g/dl, limite fissato dal Decreto legislativo 30/12/1992 n. 533, raggiungendo, nel 56% dei casi, valori addirittura superiori ai 14 g/dl attesi, forse a seguito di eritrocitosi.

Il PCV ha fatto rilevare nel 79% dei campioni valori inferiori al minimo valore atteso (30%), confermando la possibile presenza di scompensi idrici negli animali esaminati.

I WBC sono risultati significativamente influenzati dalla fase fisiologica ( $p=0.0213$ ), facendo rilevare solamente in un caso valori inferiori al limite minimo atteso ( $4-15 \cdot 10^3/u$ l).

## CONCLUSIONI

Dai risultati emersi possiamo sottolineare l'importanza della stretta relazione che lega i parametri ematici allo stadio fisiologico ed all'attitudine produttiva dell'animale (lattifere: asciutta, transizione, fresche, lattazione e tarda lattazione, ma anche primipare e pluripare; vitelli: 3-4 mesi, 12-14 mesi e 18-24 mesi), come suggerito da numerosi Autori (Bertolin e coll., 2002; Ravarotto e coll., 2000).

In questa ricerca si sono dimostrati particolarmente sensibili al superamento dei valori attesi AST, CHO, TR, NEFA, AL, PCV e N/L, ed è su questi che, a nostro avviso, dovrebbe essere mirato un attento monitoraggio, anche in assenza di cali produttivi. Tali controlli potrebbero essere effettuati proprio durante le fasi produttive apparse anche in questo lavoro come le più critiche: la *transition cow* ed i primi stadi della lattazione (Goff & Horst, 1997).

Inoltre, l'interpretazione dei parametri ematici, soprattutto se finalizzata alla

valutazione dello stato di *welfare*, appare in continua evoluzione: basti pensare ai tentativi di individuazione di nuovi valori di riferimento operata da Bertoni e coll. (2000) per le bovine da latte, e a cura dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna in collaborazione con il Centro di Referenza Nazionale per il Benessere Animale per i suinetti (20-40, 40-60, 60-80, 80-100 gg di età) e per le scrofette (120-180 gg).

Una nuova sfida, per di più, viene lanciata verso la standardizzazione delle metodiche di prelievo e di analisi, a tutto vantaggio del confronto fra i risultati ottenuti dai diversi Autori, così come verso l'identificazione di nuovi parametri non influenzati dallo stress provocato dalle fasi di prelievo, soprattutto in animali allevati *outdoor*, oggi in costante aumento.

#### BIBLIOGRAFIA

- ARCHETTI I., RAVAROTTO L. (2002). Esame emocromocitometrico e formula leucocitaria mediante strumento Cell-Dyn 3500®. In: La valutazione del benessere nella specie bovina. AMADORI M. & ARCHETTI I. (a cura di). Ed. Fondaz. Iniz. Zooprof. Zoot., Brescia: 77-83.
- BERTOLIN P., BORTOLUZZI M., RAVAROTTO L. (2002). Analisi dei parametri chimico-clinici impiegati quali indicatori di benessere animale. In: La valutazione del benessere nella specie bovina. AMADORI M. & ARCHETTI I. (a cura di). Ed. Fondaz. Iniz. Zooprof. Zoot., Brescia: 95-107.
- BERTONI G. (2000). Parametri endocrini e metabolici nella valutazione del benessere animale. Workshop "Stato di benessere ed efficienza riproduttiva negli animali di interesse zootecnico", 3-4 maggio, Viterbo: 17-25.
- BERTONI G. (2002). Il benessere animale: sue motivazioni e criteri di valutazione. Atti Soc. Agr. Lombardia, *Bullettino dell'Agricoltura*, 1 (III): 29-71.
- 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 Vet.*, suppl.: S261-S268.
- BONO G. (2001). Discomfort and stress indicators in farm animals. *SIS Vet. An. Meet. Sel. Abs.*, III: 18-30.
- CALAMARI L., BIONAZ M., TREVISI E., BERTONI G. (2004). Preliminary study to validate a model of animal welfare assessment in dairy farms. Reprints 5<sup>th</sup> Congr. EURSAFE – Science, Ethics & Society, Ed. Johan De Tavernier & Stefan Aerts, Katholieke Uni. Leuven: 38-42.
- CASTILLO C., HERNANDEZ J., BRAVO A., LOPEZ-ALONSO M., PEREIRA V., BENE-DITO J.L. (2005). Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet. J.*, 169: 286-292.
- GOFF J.P., HORST R.L. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.*, 80: 1260-1268.
- HOLTENIUS K., PERSSON WALLER K., ESSÉN-GUSTAVSSON B., HOLTENIUS P., HALLÉN SANDGREN C. (2004). Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. *The Vet. J.*, 168: 65-73.
- JMP (2002). J.M.P. User's Guide ver. 5.0, S.A.S. Institute Inc., Ed. Cary (NC), U.S.A..
- LADEWIG J. (2000). Chronic intermittent stress: a model for the study of long-term stressors. In: *The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare*. Ed.

- MOBERG G.P. & MENCH J.A., CABI Pub., NY USA: 159-169.
- RAVAROTTO L., DALVIT P., PARENTI E., BETTIO M., BARBERIO A., MARANGON S. (2000). Studio di alcuni parametri biochimici ed ematologici nel vitellone di razza Charolaise. *La Sel. Vet.*, suppl.: S233-S242.
- RUKKWAMSUK T., KRUIP T.A., WENSING T. (1999). Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Vet. Quarterly*, 21: 71-77.
- 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 Vet.*, 31 (205): 25-32.
- ZAHOREC R. (2001). Ratio of neutrophil to lymphocyte counts – rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl. Lek. Listy.*, 102 (1): 5-14.