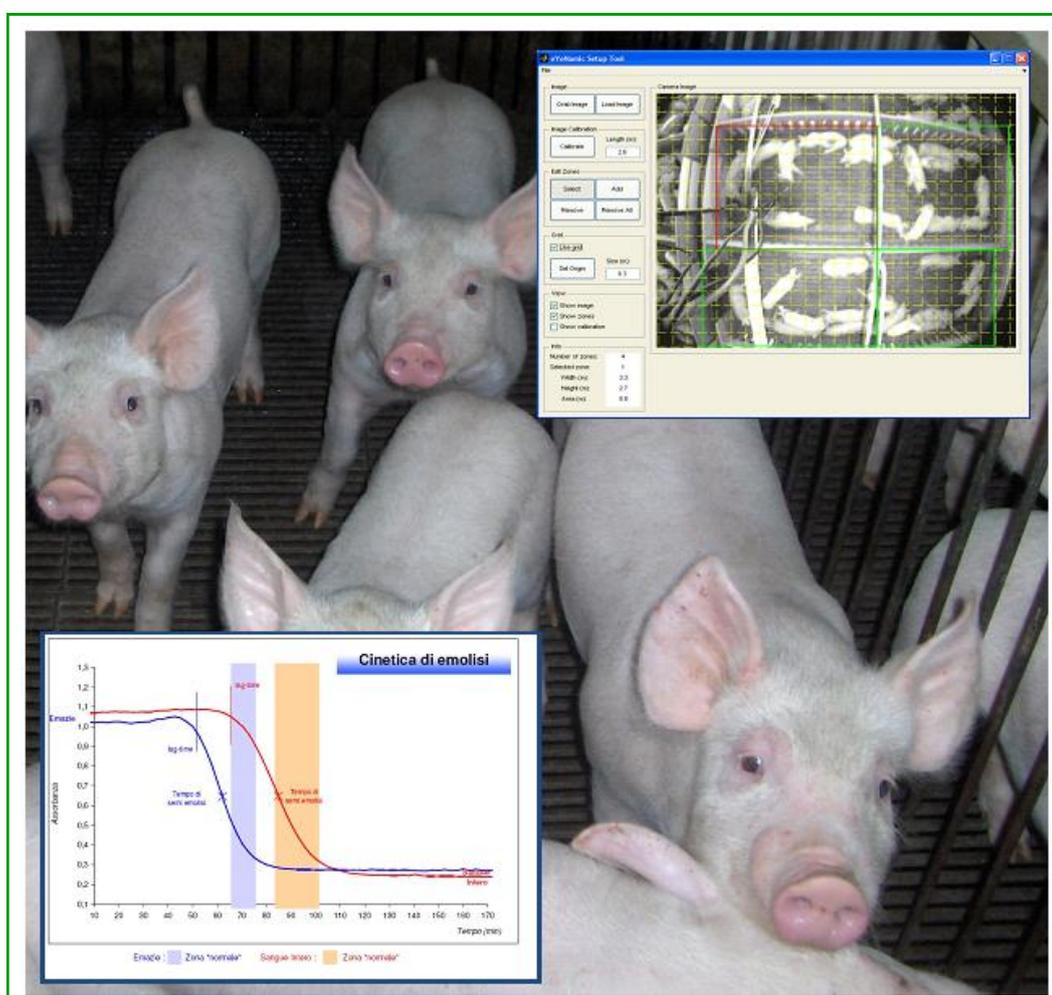




www.regione.lombardia.it

Nuove metodologie per la valutazione oggettiva del benessere animale nella specie suina



Quaderni della Ricerca
n. 137 - ottobre 2011

LOMBARDIA. COSTRUIAMOLA INSIEME.



Regione Lombardia
Agricoltura

Sperimentazione condotta nell'ambito del progetto di ricerca n. 1202: Nuove metodologie per la valutazione oggettiva del benessere animale nella specie suina - (D.g.r. 02/04/2008 n. VIII/6924 - Piano per la ricerca e lo sviluppo 2008).

Testi a cura di:

Dr. Raffaella Rossi¹, Dr. Grazia Pastorelli¹, Dr. Susanna Cannata¹,
Dr. Marcella Guarino¹, Dr. Annamaria Costa¹, Dr. Federica Borgonovo¹,
Dr. Paolo Candotti², Dr. Michel Prost³,
Prof. Carlo Corino¹

Hanno realizzato le attività sperimentali:

¹Università degli Studi di Milano
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare
Facoltà di Medicina Veterinaria
Via Celoria, 10 - 20133, Milano
Tel. +39 02 503 17900 Fax +39 02 503 17898

²Centro Benessere Animale e Immunoprofilassi
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Via Bianchi, 9 - 25124 Brescia
Tel: +39 030 22901 Fax +39 030 2425251

³ Kirial International
Rue Des Mardos 3
21560 Couternon, Francia

⁴ Katholieke Universiteit Leuven
Kastelpark Arenberg 30
30001 Heverlee, Belgio

⁵ Consorzio Powerfeed
Località Campone
21010 Costa de Nobili, Pavia

Referente: Prof. Carlo Corino
e-mail: carlo.corino@unimi.it

Per informazioni:

Regione Lombardia – Direzione Generale Agricoltura
U.O. Innovazione, cooperazione e valorizzazione delle produzioni
Struttura Ricerca, innovazione tecnologica e servizi alle imprese
Piazza Città di Lombardia, 1 – 20124 Milano
Tel. +39 02 6765 3790 – Fax +39 02 6765 8056
e-mail: agri_ricerca@regione.lombardia.it
Referenti: Gianpaolo Bertoncini- Tel. 026765 2524
e-mail: gianpaolo_bertoncini@regione.lombardia.it
Maria Lina Sandionigi - Tel. 02 6765 2579
e-mail: maria_lina_sandionigi@regione.lombardia.it

© Copyright Regione Lombardia



Regione Lombardia
Agricoltura



VSA
Veterinaria per la Sicurezza Alimentare



Powerfeed
CONSORZIO



Krid
Internazionale

Nuove metodologie per la valutazione oggettiva del benessere animale nella specie suina

Quaderni della Ricerca
n. 137 – ottobre 2011

Presentazione



L'allevamento suinicolo lombardo, con un patrimonio di 4,9 milioni di capi, pari al 53,3% di quello nazionale, rappresenta con le imprese di macellazione e trasformazione una realtà di filiera rilevante nel panorama zootecnico, che si distingue nel contesto europeo per tipologia di allevamento e qualità delle produzioni.

Il settore è condizionato da alcuni anni dagli effetti di una crisi dovuta a vari fattori, tra i quali prevalgono l'aumento dei prezzi delle materie prime per l'alimentazione, il calo ricorrente delle quotazioni dei suini pesanti, la difficoltà dei componenti della filiera a condividere obiettivi per un'efficace valorizzazione del prodotto sul mercato nazionale ed estero.

Incrementare la qualità delle produzioni, migliorare il reddito aziendale, garantire la salute del consumatore: sono queste le priorità del settore, che non possono però prescindere dal benessere degli animali, come previsto anche dalla normativa europea.

Attraverso il finanziamento di progetti di ricerca, la DG Agricoltura da anni approfondisce temi tecnico-scientifici per fornire agli allevatori indicazioni utili al miglioramento della gestione aziendale e alla valorizzazione delle caratteristiche di qualità e tipicità dei prodotti. Le conoscenze acquisite consentono soprattutto alle nostre imprese agricole e zootecniche di adeguarsi alle modifiche della normativa comunitaria in materia di sostenibilità ambientale e benessere animale.

In questo contesto si colloca la ricerca "Nuove metodologie per la valutazione oggettiva del benessere animale nella specie suina" che ha sperimentato due tecniche innovative. La prima, mediante test ematici, ha misurato la capacità dell'organismo di contrastare lo stress ossidativo causato dai radicali liberi, sostanze che, in particolari condizioni di deficit dei meccanismi riparatori delle cellule, possono diventare dannose. La seconda tecnica ha invece valutato il comportamento e l'attività degli animali mediante l'utilizzo di videocamere collegate a computer (Zootecnia di Precisione) e l'elaborazione di indici di attività e di occupazione quali indicatori del benessere.

L'applicazione di queste metodiche in allevamenti di tipo intensivo, grazie a migliori e più controllate condizioni di salute degli animali e al conseguente minor uso di farmaci, contribuisce a garantire la maggiore sicurezza alimentare delle produzioni e migliora le rese produttive e di crescita che incrementano la redditività aziendale.

Giulio De Capitani
Assessore all'Agricoltura
Regione Lombardia

SOMMARIO

INTRODUZIONE	
Lombardia e patrimonio suinicolo	7
Benessere Animale	7
Benessere Animale ed Unione Europea	8
Valutazione del benessere	9
Indicatori di benessere	10
Nuove metodologie per la valutazione oggettiva del benessere	13
Attività antiradicalica globale del sangue	13
Zootecnia di Precisione	15
OBIETTIVO DELLA RICERCA	18
MATERIALI E METODI	19
INDICATORI FISIologici ED IMMUNOLOGICI	
Capacità antiradicalica globale del sangue mediante KRL test	19
Dosaggio dell'aptoglobina sierica e del cortisolo	21
Esame emocromocitometrico ed Analisi chimico-cliniche	21
INDICATORI COMPORTAMENTALI	
Zootecnia di precisione	22
Rilievo dei parametri ambientali	25
Rating scale etologico comportamentale	26
Analisi Statistica	27
RISULTATI	
Attività antiradicalica totale del sangue	28
Zootecnia di precisione	47
CONCLUSIONI	64
Bibliografia	66

INTRODUZIONE

LOMBARDIA E PATRIMONIO SUINO

L'allevamento suinicolo rappresenta uno dei punti di forza della zootecnia italiana e in particolare di quella lombarda con caratteristiche, quantitative e qualitative, uniche nel panorama dell'agricoltura nazionale e in quello dell'Unione Europea, avendo infatti un ruolo di rilievo sia in termini di capi allevati che di quantità e valore della produzione.

Nel 2009 il comparto suinicolo in Lombardia ha evidenziato un valore di 937 milioni di euro, con una produzione di oltre 825.800 tonnellate di carni. Nello stesso anno il numero di allevamenti era di 4.341 (pari al 19,4% delle aziende con allevamento in Lombardia) con un numero medio di capi 10 volte superiore a quello italiano (ISTAT, 2009).

Nel 2010, il patrimonio suinicolo nazionale si è attestato a 9.321.100 capi con una progressione dell'1,8% rispetto al 2009. A livello regionale, la Lombardia rimane la regione leader, con 4,9 milioni di capi pari al 53,3% del patrimonio suinicolo nazionale, con un aumento del 3,2% rispetto all'anno precedente (ERSAF, 2010).

BENESSERE ANIMALE

La definizione dello stato di "benessere degli animali di allevamento" costituisce una problematica di attualità nei paesi più sviluppati, dove, tecnologie di allevamento sempre più sofisticate ed esigenze produttive crescenti, costringono gli animali a performance maggiori in condizioni ambientali e fisiologiche sempre più lontane da quelle "naturali".

Il rispetto del benessere animale è comunque un'esigenza per l'intera filiera produttiva in quanto in stretta relazione con i risultati globali d'allevamento in termini di efficienza produttiva e riproduttiva, associati a ridotta necessità d'uso d'antibiotici e chemioterapici e quindi con garanzie superiori in termini di sicurezza alimentare ed ambientale.

Il benessere animale ha inoltre una forte influenza sul grado di accettabilità del prodotto da parte del consumatore, in quanto viene percepito come indice di qualità del prodotto finito.

Il benessere animale si fonda su cinque "libertà":

1. libertà dalla fame, dalla sete e dalla cattiva nutrizione;
2. libertà dai disagi ambientali;
3. libertà dalle malattie e dalle ferite;

4. libertà di poter manifestare le caratteristiche comportamentali specie-specifiche;

5. libertà dalla paura e dallo stress.

Numerosi autori hanno proposto una definizione di “benessere animale”. Tra tutte le definizioni, quella data da Hughes e Duncan nel 1988 può essere considerata sufficientemente esaustiva: “Il benessere è uno stato generale di buon equilibrio fisico-mentale in cui l’animale si trova in armonia con l’ambiente circostante”. Appleby e Hughes (1996) più recentemente riassumono così il concetto: *“il benessere animale rappresenta il soddisfacimento dei bisogni fisici, ambientali, nutritivi, comportamentali e sociali dell’animale o di gruppi di animali sotto la cura, la supervisione o l’influenza delle persone”*.

BENESSERE ANIMALE ED UNIONE EUROPEA

L'Europa vanta una elevata sensibilità e una lunga tradizione per il rispetto degli animali con standard di benessere animale tra i più elevati al mondo, come evidenziato dai numerosi report scientifici della Commissione Europea sul tema del benessere animale (EU legislative references).

Questa tradizione viene mantenuta e rafforzata, attingendo alle nuove esperienze e alle crescenti conoscenze sul comportamento degli animali e sulla evidente relazione tra benessere e salute degli animali e benessere e salute dell'uomo.

Il quadro generale di azione comunitaria è determinato da piani d'azione progressivi, quali il piano d'azione comunitario per la protezione e il benessere degli animali 2006-2010.

Le cinque aree in cui si è intervenuto sono state:

- aggiornamento degli standard minimi attuali nell’ambito della protezione e del benessere degli animali;
- impegno prioritario per la promozione di una ricerca futura orientata verso le politiche e l’applicazione del principio “sostituzione, affinamento e riduzione”;
- introduzione di indicatori standardizzati del benessere degli animali;
- attività volte a rendere tutti gli attori della filiera più consapevoli ed informati sulle norme relative alla protezione e al benessere degli animali;
- sostegno e avvio di iniziative internazionali volte a sensibilizzare e creare maggiore consenso sulle tematiche relative al benessere degli animali.

Il 23 marzo 2010 la Commissione Europea Agricoltura e Sviluppo rurale ha proceduto alla stesura di un report sulla valutazione e la verifica del programma d'azione per il benessere degli animali 2006-

2010 con risultati soddisfacenti. E' stata inoltre evidenziata la necessità di un nuovo programma d'azione per il benessere degli animali per il periodo 2011-2015 incentrato sui seguenti punti:

1. normativa europea comune in materia di benessere degli animali;
2. centro europeo per la salute e il benessere degli animali;
3. migliore applicazione della legislazione in vigore;
4. nesso tra salute animale e salute umana;
5. indicatori e nuove tecniche.

Le direttive Europee sul benessere animale, sono state recepite dalla legislazione Italiana, a partire dal 1973 (Legge 12 aprile 1973, n. 222, Ratifica ed esecuzione della convenzione europea sulla protezione degli animali nei trasporti internazionali) fino all'ultima, riguardante anche il settore suinicolo (D.L. del 25 giugno 2007 n. 151) relativa alle “Disposizioni sanzionatorie per la violazione delle disposizioni del regolamento (CE) n. 1/2005 sulla protezione degli animali durante il trasporto e le operazioni correlate”.

VALUTAZIONE DEL BENESSERE

Un primo problema in materia di benessere animale è dato dalla necessità di indicare le modalità di valutazione. I termini “benessere” e “sofferenza” degli animali risultano molto difficili da definire (Duncan e Dawkins, 1983). Da un esame della letteratura in materia emerge che il concetto di benessere dell'animale, a causa della vastità che può raggiungere nelle diverse accezioni, può essere valutato secondo ottiche e con strumenti molto differenti.

Da un punto di vista metodologico il benessere nella specie suina può esser valutato utilizzando diversi tipi di approccio (Duncan e Fraser, 1997), ognuno fortemente influenzato da un differente modo di interpretare il benessere e la sofferenza animale:

- **Approccio basato sui “feelings”** o sensazioni soggettive degli animali. I ricercatori che abbracciano questo tipo di approccio sottolineano la capacità da parte degli animali di provare stati affettivi ed emozionali (Bono, 2000). La ricerca si basa sulla misurazione delle preferenze dell'animale e sulla forza della sua motivazione attraverso test di preferenza o di avversione. Vengono utilizzati indicatori comportamentali ed alcuni indicatori fisiologici di stati emotivi.
- **Approccio “naturale”**. Si basa sul principio che gli animali debbano esser in grado di manifestare in maniera completa il proprio repertorio comportamentale. Si confronta il comportamento di animali nel loro ambiente naturale con quello di animali allevati in cattività. Il livello di benessere è tanto maggiore quanto più l'animale è in grado di esprimere l'*etogramma* specie-specifico.

- **Approccio “funzionale”.** Il normale funzionamento dei sistemi biologici dell’animale, associato a buone prestazioni produttive, viene considerato già di per sé come indicatore di un soddisfacente stato di benessere, in contrasto con una condizione di malattia, malnutrizione, scarsa produttività o bassa longevità. Si basa sulla misurazione di parametri oggettivi dati da indicatori fisiologici, patologici, produttivi e da alcuni indicatori etologici (Aguggini et al., 1998).

L’approccio funzionale sembrerebbe quello che maggiormente si presta ad essere sviluppato nella valutazione del benessere della specie suina. La migliore valutazione di benessere o di sofferenza, considerati come opposti di una stessa condizione, può essere ottenuta solo tenendo conto di tutti i possibili indicatori disponibili come stato di salute, produttività, parametri fisiologici, biochimici e comportamentali (Duncan, 1981).

INDICATORI DI BENESSERE

Indipendentemente dal tipo di approccio risulta utile, per valutare lo stato di benessere di un animale, servirsi di diversi indicatori. Secondo Waiblinger et al., (2001), gli indicatori di benessere utilizzabili in allevamento dovrebbero rispondere ai seguenti requisiti:

- 1) includere misure accurate e valide;
- 2) essere facilmente utilizzabili da tecnici opportunamente addestrati;
- 3) richiedere un tempo limitato per l’esecuzione per poter effettuare misure ripetute in molte aziende;
- 4) rilevare le cause di riduzione del benessere e proporre miglioramenti nella gestione del sistema.

Si ha infatti la necessità di quantificare con criteri oggettivi lo stato di benessere e di interpretare il significato delle interazioni animale-ambiente.

Nella valutazione del benessere vengono utilizzati indicatori:

- **fisiologici:** la frequenza cardiaca e respiratoria, la glicemia, il colesterolo, le proteine totali, i glucocorticoidi, status ossidativo, sono tra gli indicatori fisiologici più comunemente utilizzati. Vengono inoltre utilizzati indicatori dello status immunitario quali l’attività battericida sierica, l’aptoglobina, il lisozima.
- **comportamentali:** includono vari test standardizzati, finalizzati soprattutto alla ricerca dei metodi di valutazione delle relazioni animale-uomo (test paura-timore), del livello di comfort, delle interazioni sociali tra gli animali e della presenza di stereotipie.

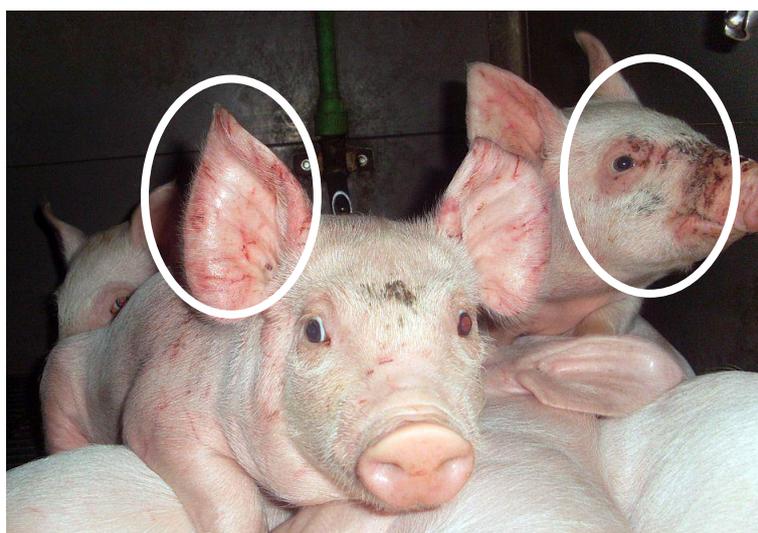
- **produttivi:** rappresentano elementi altrettanto importanti di valutazione di benessere. Infatti solo in buone condizioni di benessere gli animali sono in grado di esprimere al meglio le proprie capacità produttive e riproduttive.
- **patologici:** possono essere valutati il ridotto accrescimento, l'incidenza di ulcere gastriche, le parassitosi, l'immunosoppressione, l'ipofertilità. 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.

Non sempre l'utilizzo di indicatori comportamentali è di facile applicazione a causa dei lunghi tempi che richiedono le osservazioni di un adeguato numero di capi. A questa problematica si potrebbe far fronte mediante l'utilizzo di 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.

Nella valutazione del benessere vanno quindi considerate una serie di risposte che l'animale mette in atto per adattarsi all'ambiente ed agli eventuali stress che costituiscono un elemento destabilizzante per l'omeostasi metabolica dell'animale.

Alcuni comportamenti anomali possono costituire un valido strumento per l'individuazione di situazioni potenzialmente "pericolose" in quanto conseguenza di presenza di stressors ambientali (Figura 1).

Figura 1. Lesioni etero-dirette a grugno e orecchie



A seconda della durata dello stimolo stressogeno si possono avere le seguenti reazioni (Henry & Stephens, 1977): reazione 'attiva' di 'lotta-fuga' e reazione 'passiva' di 'depressione'. A tali reazioni

corrispondono cambiamenti di funzioni biologiche che possono portare alla comparsa di stati pre-patologici e di patologie clinicamente conclamate. I numerosi stimoli stressanti presenti nell'allevamento di tipo intensivo possono portare all'insorgenza dello stress ossidativo. Lo stress ossidativo è un tipo di stress chimico indotto dalla presenza, in un organismo vivente, di un eccesso di specie chimiche reattive all'ossigeno (ROS). In condizioni normali, l'organismo riesce a prevenire il danno da radicali liberi grazie a sistemi naturali di difesa antiossidanti enzimatici o chimici. In presenza di un'aumentata produzione di ROS e/o di una ridotta efficienza dei sistemi fisiologici di difesa antiossidante ci si trova in una condizione di squilibrio definita come stress ossidativo (Sies, 1997).

Brambilla et al., (2002) riportano come questo parametro possa essere utilizzato come un indicatore di benessere nella specie suina. Nello studio si evidenzia che suini in condizioni di benessere ottimale presentano una situazione di bilanciamento tra produzione di ROS e loro neutralizzazione da parte di sistemi antiossidanti. In caso di condizioni di stress cronico si ha uno sbilanciamento di tale equilibrio con comparsa dello stress ossidativo. Inoltre si è evidenziato come l'insorgenza di numerose patologie quali polmoniti, enteriti e sepsi sembrano essere associate ad una situazione di stress ossidativo (Lauritzen et al., 2005; Lykkesfeldt et al., 2007).

Alcuni momenti fisiologici particolarmente delicati, quali il post-svezzamento, sono spesso accompagnati da insorgenza di stress ossidativo con conseguente immunodepressione (Sauerwein 2005; Favier 2003).

Sulla base di quanto detto si evidenzia che un miglioramento del benessere può contribuire a migliorare le difese immunitarie dell'organismo. Il rispetto del benessere animale diviene quindi un'esigenza per l'intera filiera produttiva in quanto in stretta relazione con una ridotta necessità d'utilizzo di antibiotici e con garanzie superiori in termini di sicurezza alimentare ed ambientale.

Questo punto di fondamentale importanza viene ripreso nel programma d'azione per il benessere degli animali per il periodo 2011-2015 nel quale si mette in relazione il benessere animale con la salute pubblica con particolare riferimento ai fenomeni di antibiotico-resistenza e zoonosi.

Non sussiste ad oggi, a nostra conoscenza, un dato sintetico di valutazione oggettiva del benessere animale applicabile in azienda in grado di valutare contemporaneamente le problematiche di ordine comportamentale e fisiologico. Si ritiene quindi che l'applicazione di nuove metodologie di valutazione oggettiva del benessere possa essere utile al fine di portare nuove conoscenze in questo ambito.

NUOVE METODOLOGIE PER LA VALUTAZIONE OGGETTIVA DEL BENESSERE

Il progetto di ricerca ha affrontato il problema della validazione di nuove metodologie di valutazione oggettiva del benessere animale nell'allevamento suino di tipo intensivo, per permettere una valutazione sintetica di tale parametro in allevamento.

Le metodologie prese in considerazione sono state:

- **attività antiradicalica globale del sangue valutata mediante l'utilizzo del test KRL;**
- **valutazione del comportamento e dell'attività degli animali mediante la zootecnia di precisione.**

ATTIVITÀ ANTIRADICALICA GLOBALE DEL SANGUE

Secondo l'approccio funzionale le condizioni di squilibri fisiologici, di differente origine, in grado di condurre verso condizioni di malessere e patologie possono essere evidenziate attraverso la valutazione dello stress ossidativo (Brambilla et al., 2002).

Negli ultimi 20 anni si è registrato un interesse crescente nei confronti della biologia dei radicali liberi (ROS) in quanto ritenuti concausa dell'insorgenza di numerose patologie.

I ROS si formano naturalmente durante il metabolismo cellulare ed in condizioni normali essi vengono neutralizzati da fattori di protezione enzimatici (superossido dismutasi, catalasi, glutatione perossidasi) e chimici (oligoelementi, vitamina C, vitamina E, carotenoidi, polifenoli).

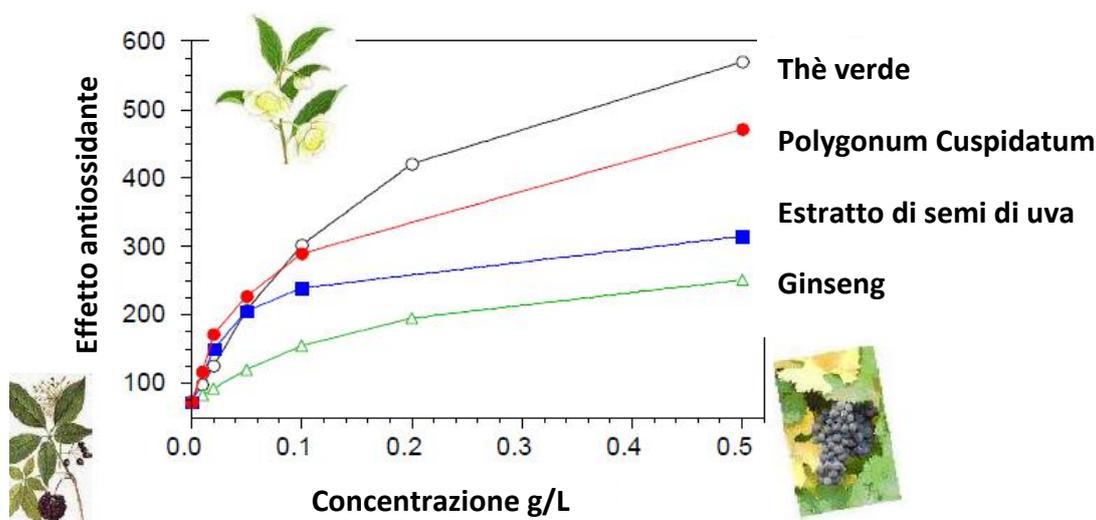
Diversi stimoli (raggi UV, stress, inquinamento, alimentazione non bilanciata) possono aumentare la formazione di ROS con effetti negativi sia a livello cellulare che tissutale. Lo stress ossidativo non è una condizione statica ma è il risultato dell'interazione dinamica tra ROS e antiossidanti. La stima di tale parametro dovrebbe infatti comprendere una misura adeguata di entrambe le parti coinvolte. Tuttavia l'eterogeneità degli antiossidanti rende difficile la determinazione di ogni singola molecola e le possibili interazioni tra diversi antiossidanti *in vivo* rendono la misura di ciascun elemento non rappresentativa dell'intero stato antiossidante dell'organismo. Tra le molte tecniche in uso per misurare l'attività antiossidante sono da ricordare l'ORAC (Oxygen Radical Adsorbance Capacity) (Cao et al., 1993), il saggio sulla chemiluminescenza (Whitehead et al., 1992), il FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant Power) (Benzie & Szeto, 1999), il saggio TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Miller et al., 1993) e l'OXY-Adsorbent test applicabili su siero o plasma. La differenza esistente tra le diverse metodiche elencate ed in particolare, tra i principi su cui esse si basano, ha condotto a risultati a volte contrastanti.

Tenuto conto dell'insieme dei composti (vitamine, antiossidanti, pro-ossidanti) e dei sistemi enzimatici che intervengono nel sistema di difesa antiradicalica, nessuno dei test normalmente in uso è in grado di fornire una valutazione globale della capacità di resistenza di un individuo a fronte di un'aggressione di radicali liberi. Un approccio globale è stato messo a punto da ricercatori francesi per valutare l'insieme delle numerose variabili messe in gioco simultaneamente nell'essere vivente per la sua difesa antiradicalica (Prost, 1992). Una notevole differenza rispetto alle metodiche citate riguarda il campione sottoposto ad analisi: i metodi tradizionali utilizzano plasma o siero, il KRL permette la valutazione dello stato delle difese antiradicalica globali a livello di sangue intero e di emazie (Blanche e Prost, 1992).

Il KRL (kit radicali liberi) è un test biologico utilizzato per la determinazione della capacità antiradicalica globale del sangue che misura il tempo necessario ad emolizzare il 50% dei globuli rossi, esposti ad un attacco di radicali liberi, in condizioni strettamente controllate e standardizzate. In queste condizioni le cellule mobilitano tutti i sistemi antiossidanti enzimatici e molecolari per contrastare tale attacco. Il test KRL presenta numerose applicazioni *in vitro* per la valutazione del potenziale globale antiradicalico di sostanze antiossidanti come ad esempio il butilidrossitoluene (Blanche et al. 1991) estratti naturali (Rossi et al., 2009) e vitamine (Stoker et al., 2003). In Figura 2 si riporta l'effetto antiossidante, misurato con test KRL di alcuni estratti naturali.

Numerose applicazioni in ambito umano hanno inoltre permesso di discriminare tra condizioni di benessere e di stress di medio o alto livello e di diversa origine (Lesgards et al., 2002). Si è anche evidenziato come la presenza di patologie porti alla riduzione della capacità antiradicalica globale del sangue (Blanche et Prost 1992).

Figura 2. Effetto antiossidante di alcuni estratti vegetali (immagine concessa da Dr. Michel Prost)



ZOOTECNIA DI PRECISIONE

L'impellente e improvvisa necessità di incrementare la razione alimentare di proteine nobili, dei cittadini europei, ha determinato, durante il secondo dopoguerra, lo sviluppo di un'agricoltura e di una zootecnia a carattere intensivo. A quel tempo il risultato più importante conseguito fu quello di incrementare in poco tempo sia la produttività che l'efficienza; "solo" cinquant'anni dopo, la coscienza etica delle produzioni agricole è stata costretta ad un brusco "risveglio". Infatti, gli scandali legati alle frodi del settore agroalimentare (dalla carne agli ormoni ai polli alla diossina e alla BSE) hanno determinato nel consumatore una maggiore consapevolezza del sistema produttivo costringendo sia il legislatore che l'allevatore a profondi cambiamenti. *In primis*, la reazione degli allevatori a queste emergenti problematiche è stata quella di iniziare a proporre nuove tipologie di zootecnia che permettessero di giungere ad una produzione identificabile come "animal friendly" (o biologica od organica) al fine di dare al consumatore rassicurazioni sul benessere degli animali e, soprattutto, sulla sicurezza alimentare delle produzioni ottenute (Blaha, 2005).

I ricercatori europei, sempre più sollecitati da queste problematiche, si sono ritrovati la scorsa primavera a Berlino dove si è svolta la prima Conferenza Europea sulla Zootecnia di Precisione (o PLF = Precision Livestock Farming): in questo meeting internazionale si sono poste le basi scientifiche di una nuova disciplina che potrà influire enormemente sulle modalità e sulla qualità delle produzioni.

Tra i principali obiettivi della zootecnia di precisione c'è lo sviluppo di strumenti per il monitoraggio on-line, ed in modo completamente automatico, del comportamento degli animali e della loro risposta biologica. Il fine ultimo è analizzare, in continuo, i dati fondamentali per la predisposizione delle più opportune strategie aziendali come, per esempio, la regolazione del razionamento in funzione della crescita. (Morag et al., 2001; Halachmi et al., 2002; Aerts et al., 2003).

I Principi

Nel passato l'allevatore prendeva le decisioni manageriali riguardanti la sua azienda basandosi sull'osservazione diretta della mandria e sulla propria esperienza (Frost et al., 2003).

Oggi l'allevatore deve confrontarsi con una realtà aziendale completamente diversa sia per il numero dei capi allevati (diverse centinaia per quanto riguarda i bovini da latte e da carne ed alcune migliaia per i suini), sia per il ruolo, sempre più imprenditoriale e manageriale, che lo costringe a passare buona parte della giornata in ufficio o al mercato e, quindi, sempre più frequentemente lontano dalla vista e dal controllo diretto degli animali.

La Zootecnia di Precisione (PLF) parte dal presupposto che, se da un lato l'osservazione diretta degli animali è il punto cruciale per la definizione dello stato di salute dell'allevamento, dall'altro l'etologia, seppur importantissima, ha lo svantaggio di fornire i risultati in tempi mediamente lunghi con sforzi economici rilevanti. Per di più l'allevatore è in grado di utilizzare le moderne tecnologie che misurano diversi parametri all'interno dell'allevamento (ventilazione, razionamento ecc.), ma nessuno degli strumenti di cui oggi dispone, misura la variabile più importante del processo produttivo: l'animale e il suo stato di benessere.

La Zootecnia di Precisione definisce gli animali come complessi, individualmente diversi e differenti nel tempo (CIT = Complex, Individual e Time Variant) (Berckmans, 2003) .

In questa disciplina quindi, gli animali sono considerati come individui diversi e che danno risposte diverse nel tempo.

Questo principio è completamente diverso da quanto fino ad oggi applicato in campo zootecnico: si pensi alle curve di crescita dei broiler (pollo da carne), tuttora basate sulle medie di crescita dei diversi gruppi genetici.

Ad esempio per il monitoraggio e il controllo del processo biologico che porta alla trasformazione del suinetto in carne, dell'insilato di mais in latte e così via, la PLF ritiene che tre debbano essere le condizioni da soddisfarsi.

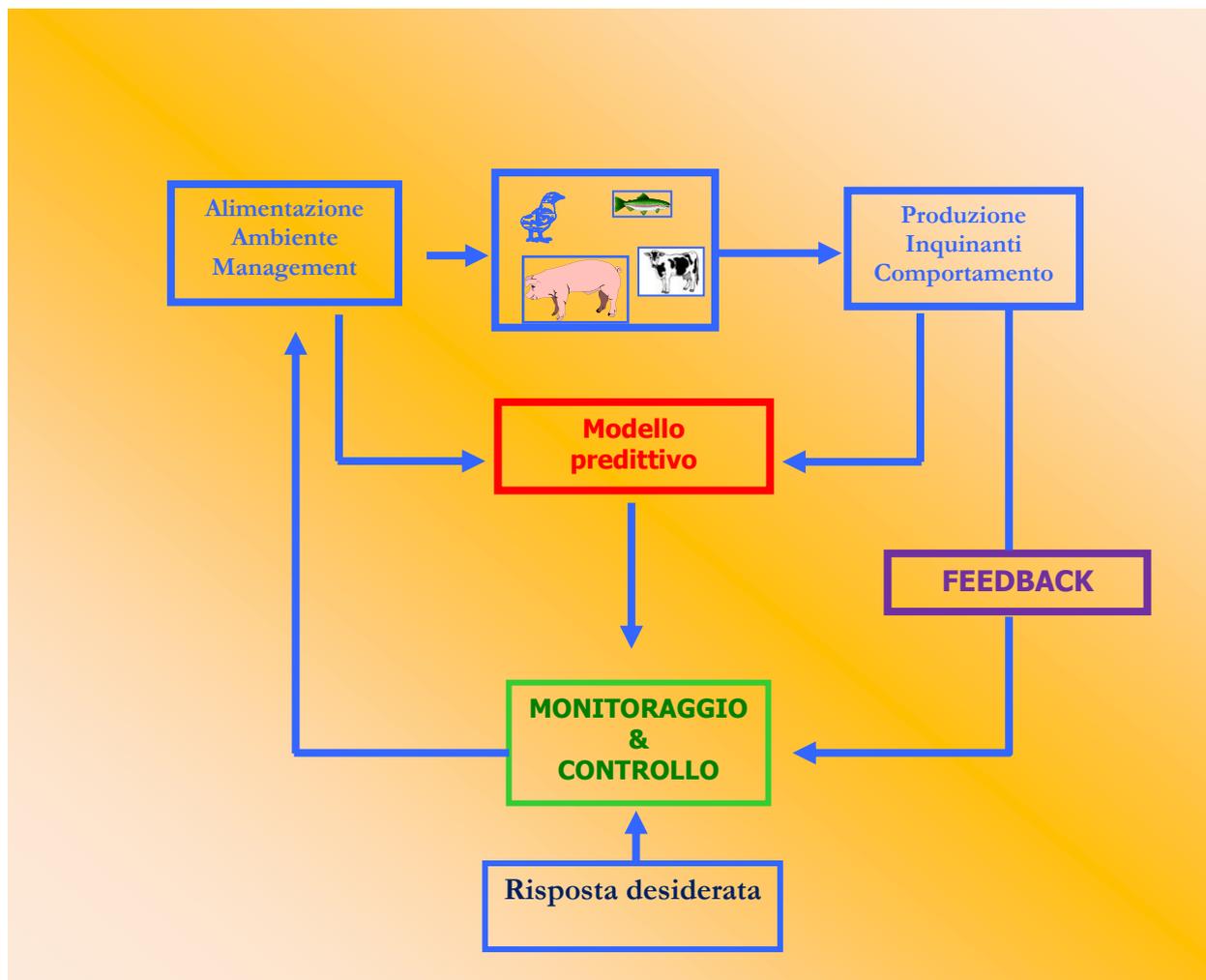
La prima condizione è dettata dalla "variabile animale" (peso, attività, comportamento, assunzione di cibo, rumore prodotto, variabili fisiologiche come la temperatura corporea, la frequenza cardiaca, respiratoria ecc.) e deve essere misurata in continuo. Quando si parla di misurazioni in continuo si intende che, a seconda della variabile, la frequenza di rilevamento sia effettivamente elevata. Ad esempio l'analisi delle immagini, può essere efficacemente impiegata per lo studio del comportamento animale, fornendo 25 immagini al secondo che vengono istantaneamente elaborate.

La seconda condizione necessaria è la capacità di fornire una previsione attendibile. Un tempo l'allevatore basava le sue previsioni sulla propria esperienza diretta; oggi la previsione di un evento si basa sull'applicazione di modelli matematici.

La terza condizione è che la previsione, insieme alle rilevazioni on-line, sia integrata in un algoritmo che permetta di monitorare gli animali in maniera automatizzata e continua così da ottenere le informazioni necessarie per l'attuazione delle corrette strategie di controllo (dalla ventilazione al razionamento, ecc.).

Nella Figura 3 viene schematizzato quanto riportato sopra. Per poter realizzare questi risultati la PLF utilizza diverse discipline: dalla matematica, per lo studio e l'applicazione dei modelli predittivi, alle nuove tecnologie legate allo sviluppo dei sensori. Le tecniche necessarie sono oggi disponibili: la chiave di Volta sarà riuscire a collegarle in modo da realizzare un reale approccio multidisciplinare.

Figura 3. Rappresentazione schematica delle tre condizioni necessarie per realizzare la Zootecnia di Precisione (da Aerts et al., 2003, modificata)



L'analisi dell'immagine nella Zootecnia di Precisione

Un esempio applicativo dell'analisi dell'immagine è stato riportato da Leroy et al., (2005), sviluppando un nuovo sistema per monitorare completamente e automaticamente l'attività delle galline ovaiole, per valutarne il loro benessere.

Leroy ha selezionato sei differenti comportamenti che potevano assumere le galline: ferme in piedi (standing), accovacciarsi (sitting), dormire (sleeping), pulirsi (grooming), razzolare (scratching o pecking). Questi differenti comportamenti sono riconosciuti automaticamente da un software che è stato appositamente sviluppato.

In un lavoro più recente (Costa et al., 2007) l'analisi dell'immagine è stata applicata in campo alla produzione suinicola: gli animali allevati venivano ripresi con una telecamera collegata al PC e, attraverso l'uso di un software (eYenamic), venivano calcolati l'indice di attività e l'indice di occupazione degli animali. L'indice di attività di ogni zona è inteso come la frazione del pavimento del box che risulta coperta o no dalla sagoma dell'animale per secondo, mentre la densità di occupazione o indice di uniformità di ogni zona viene intesa come la frazione del pavimento del box che risulta coperta dai suinetti per secondo.

OBIETTIVO DELLA RICERCA

Obiettivo della ricerca è stato quello di valutare la sensibilità e la riproducibilità dell'attività antiradicalica globale del sangue e della zootecnia di precisione nella valutazione del benessere nella specie suina. Accanto a queste due nuove metodologie sono stati utilizzati classici indicatori produttivi, fisiologici e comportamentali per l'interpretazione e la validazione dei risultati.

Particolare attenzione è stata rivolta alla capacità delle due metodiche nel discriminare condizioni, di allevamento e/o di alimentazione, che conducono a situazioni di migliorato o di ridotto benessere così come si osserva a seguito di specifiche integrazioni alimentari o di rimescolamento e/o di elevata densità degli animali allevati.

MATERIALI E METODI

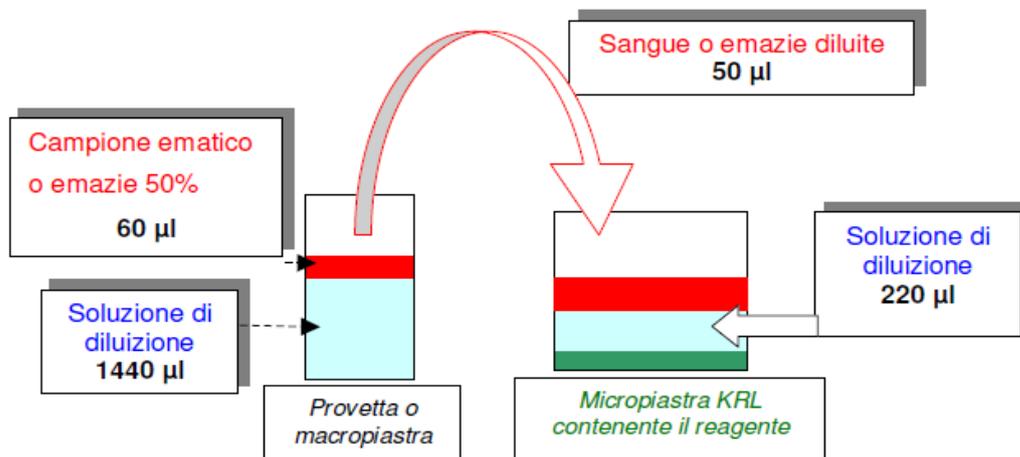
STRUMENTAZIONE UTILIZZATA E METODICHE ANALITICHE

INDICATORI FISIologici E IMMUNOLOGICI

CAPACITÀ ANTIRADICALICA GLOBALE DEL SANGUE MEDIANTE KRL TEST

Il KRL (Kit Radicali Liberi) è un test biologico utilizzato per la determinazione della capacità antiradicalica globale del sangue che misura il tempo necessario ad emolizzare il 50% dei globuli rossi, esposti ad un attacco di radicali liberi, in condizioni strettamente controllate e standardizzate. Il principio del test è infatti quello di sottoporre il sangue intero, o una sospensione di emazie, ad un attacco radicalico termocontrollato a 37°C mediante soluzione di 2,2'-azobis-(2-amidinopropane)-dihydrochloride (AAPH) (Kiral International, Digione, Francia). Per questa tipologia di analisi i campioni di sangue sono raccolti nelle provette contenenti lo 0.1% di anticoagulante EDTA, immediatamente refrigerati e sottoposti al test KRL entro 24 ore. In Figura 4 si riporta la metodica di preparazione dei campioni.

Figura 4. Metodica di preparazione dei campioni per analisi con test KRL



In queste condizioni le cellule mobilitano tutti i sistemi antiossidanti enzimatici e molecolari per contrastare tale attacco fino a quando la membrana cellulare si altererà provocando la perdita del contenuto citoplasmatico. La misura della diminuzione dell'assorbanza permette di seguire la progressiva lisi cellulare (Figura 5).

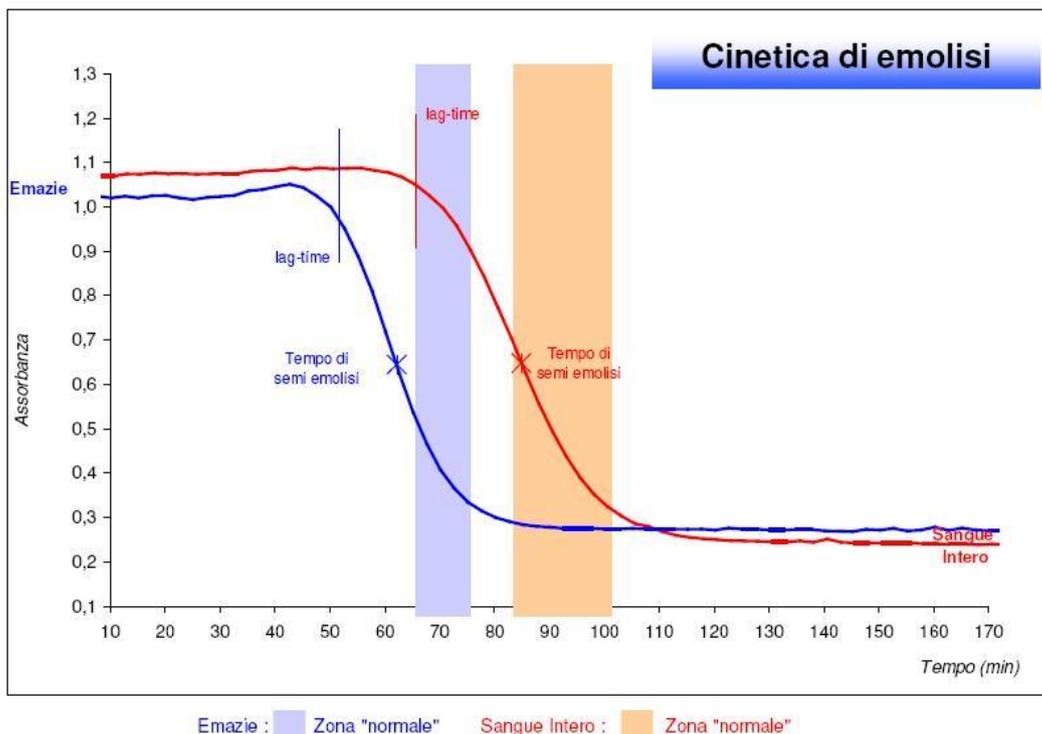
Figura 5. Meccanismo di azione del KRL test (Prost 1992).



L'analisi viene realizzata mediante utilizzo di lettore di micropiastre a 96 pozzetti. Il lettore è collegato ad un PC con software KRL che permette di controllare il funzionamento del lettore e l'acquisizione ed elaborazione dei dati. Per ogni pozzetto sono eseguite 75 misure di assorbanza a 420 nm, ogni 150 secondi, per seguire la cinetica di lisi delle cellule ematiche. La velocità massima di diminuzione dell'assorbanza (V_{max} in mUA/min), il tempo di latenza (lag-time in min) e il tempo di semi-emolisi (HT_{50} in minuti) caratterizzano la cinetica di emolisi del campione.

Questi parametri vengono calcolati automaticamente dal software KRL. Si riporta come esempio la cinetica di emolisi del campione ed i valori di riferimento evidenziati in ambito umano (Figura 6).

Figura 6. Cinetica di emolisi e valori di riferimento in umana (Blanche et Prost 1992)



I risultati vengono espressi in HT_{50} che corrisponde al tempo necessario per emolizzare il 50% delle emazie presenti nel campione. Il tempo di semi-emolisi varia in modo lineare con la concentrazione in Trolox. È possibile quindi esprimerlo in equivalenti Trolox (analogo solubile della Vitamina E). I risultati possono quindi essere standardizzati in unità di “efficacia anti-radicali liberi” (EAR). 1 unità EAR corrisponde alla potenza anti radicali liberi di una mmole di Trolox.

Dosaggio dell'aptoglobina sierica

L'aptoglobina è stata dosata nel campione di siero mediante un Kit commerciale (Phase™ Range Tridelta Ltd., Kildare, Ireland). In particolare il metodo di prova si basa sul principio della conservazione della attività pseudo-perossidasi della emoglobina (Hb) in presenza di aptoglobina (Hp), in ambiente acido. L'aptoglobina presente nel campione si lega all'emoglobina contenuta nel reagente. In ambiente acido l'emoglobina rimasta libera perde la sua attività perossidasi mentre la mantiene quella legata. La preservazione dell'attività perossidasi è quindi direttamente proporzionale alla quantità di aptoglobina presente. L'attività perossidasi viene valutata con l'aggiunta di un substrato (costituito da H_2O_2) e di un cromogeno, e la reazione colorimetrica letta allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 630 nm. Il kit contiene un calibratore a concentrazione nota di aptoglobina. La reazione è di tipo end-point che consiste nel bloccare, dopo un tempo prefissato, la reazione colorimetrica e nel misurare la concentrazione del prodotto.

Dosaggio del cortisolo

La concentrazione di cortisolo ematico è stata determinata mediante analizzatore automatico (IMMULITE ONE, Medical System, Genova) utilizzando un kit commerciale validato per l'uso in veterinaria (LKC01, Medical System, Genova, Italia).

Esame emocromocitometrico

Su tutti i campioni di sangue intero prelevati in K_3EDTA è stato eseguito l'esame emocromocitometrico mediante analisi automatica con lo strumento CELL-DYN 3500R in grado di misurare, contare e calcolare i parametri di ematologia e dotato di un software per uso veterinario.

Analisi chimico-cliniche

Gli esami relativi a protidemia, bilirubina totale e aspartato aminotransferasi sono stati eseguiti mediante analizzatore biochimico automatico Beckman SYNCRON CX5 DELTA. Il sistema SYNCRON CX5 DELTA è un analizzatore di chimica clinica ad accesso random (casuale).

INDICATORI COMPORTAMENTALI

ZOOTECNIA DI PRECISIONE

L'applicazione della Zootecnia di Precisione come analisi dell'immagine volta alla valutazione del benessere animale prevede l'utilizzo di una strumentazione costituita essenzialmente da una video camera collegata ad un Personal Computer, da cui provengono le informazioni di settaggio della modalità di registrazione e in cui i dati stessi sono conservati dopo essere stati elaborati da un software creato appositamente (eYenamic) in modo da calcolare l'indice di occupazione e di attività degli animali catturati dall'immagine.

Le componenti del sistema sono:

- PC contenuto in un box di protezione
- Video camera CCD
- Box di contenimento-protezione della video camera
- Cavo di connessione pc- videocamera
- Software eYenamic v 2.0

I box sono stati monitorati con l'utilizzo di una videocamera fissata sul soffitto, la registrazione è stata effettuata in continuo con una Camera CCD Sanyo Analog ad infrarossi collegata al PC.

Figura 7. Videocamera utilizzata per le riprese in continuo



Le lenti vengono messe a fuoco orientando l'inquadratura sui maiali e la videocamera registra le immagini con la frequenza di un secondo con una risoluzione di 768x586 dpi.

Nell'immagine sottostante viene visualizzata un frame di ripresa (Figura 8).

Figura 8. Frame di ripresa della telecamera



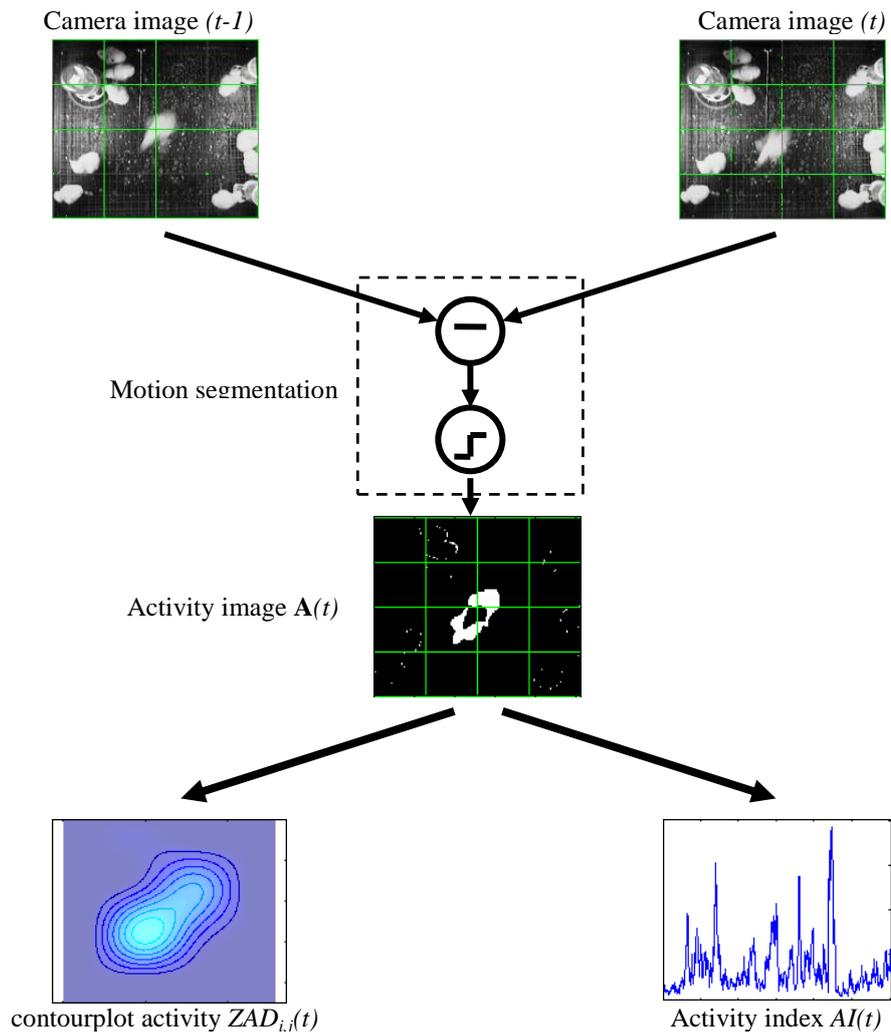
L'immagine del box registrata viene divisa in sotto-aree (Figura 9), in modo da permettere al software eYenamic (Leroy et al., 2006; Bloemen et al., 1997) di valutare alcune caratteristiche del comportamento dei suini in differenti zone dei box.

Dai frame registrati, l'immagine viene "ripulita" da falsi positivi (metodo di Otsu) per permettere all'algoritmo di calcolare l'indice di attività e di occupazione degli animali.

L'attività viene calcolata matematicamente tenendo conto della variazione del numero di pixels tra due frame in sequenza.

L'immagine, che si ottiene per differenza, è il risultato della sovrapposizione delle due immagini trasformate in scala di grigi (dal nero al bianco), a cui viene applicato un valore soglia predefinito (se c'è stato il movimento il valore è pari a 1, altrimenti a 0).

Figura 9. Processo che subiscono le immagini registrate



La densità di occupazione o indice di occupazione di ogni zona viene intesa come frazione del pavimento del box che risulta coperta dai suinetti per secondo (il concetto si basa sull'assegnazione di un numero riferito alla postura dei suinetti sul pavimento. Tale indice ha una scala da 0 a 1, dove 0 = “non sparsi” o ammassati e 1 = posizionati su tutto il pavimento o “ben sparsi”).

Dopo aver scaricato le immagini selezionate, queste sono controllate in laboratorio e sottoposte al labelling.

Al comportamento osservato è stato attribuito un punteggio:

0 = assenza di attività,

1 = aggressività,

2 = mordicchiamento,

3=comportamento anomalo inteso come l'interazione naso-naso o succhiamento reciproco (interazione suini),

4 = assunzione alimento.

La classificazione assunta non contempla l'attività di movimento o spostamento nel box in quanto gli animali presenti non hanno mostrato tale comportamento se non al momento dell'assunzione dell'alimento e/o dell'acqua (comportamento classificato con il punteggio di 4), o nelle altre attività indicate con il punteggio di 2 (aggressività) o con il 3 (comportamento anomalo).

RILIEVO DEI PARAMETRI AMBIENTALI

Il rilievo dei parametri ambientali è stato effettuato con un sistema che utilizza una centralina Fancom RS collegata a sensori all'interno del ricovero per la temperatura e l'umidità relativa interna. Per il rilievo della temperatura e dell'umidità relativa esterni al ricovero si è provveduto a posizionare una stazione meteorologica dotata di anemometro a coppette facendo attenzione a non collocarla in correnti d'aria e vicino a fabbricati (Figura 10). L'anemometro a coppette ci ha permesso anche di misurare la velocità dell'aria e la direzione del vento all'esterno del ricovero.

Figura 10. Stazione meteorologica dotata di anemometro a coppette



Per quanto riguarda invece la misurazione della portata di ventilazione all'interno del ricovero si è utilizzato un anemometro a filo caldo, tale strumento è in grado di misurare la velocità dell'aria (Figura 11).

Figura 11. Anemometro a filo caldo



Sono stati rilevati:

- la temperatura interna ed esterna al ricovero;
- la portata di ventilazione;
- l'umidità relativa interna ed esterna al ricovero.

RATING SCALE ETOLOGICO COMPORTAMENTALE

Per le rilevazioni comportamentali è stato utilizzato il Rating Scale etologico comportamentale secondo il metodo di Candotti et al., (2007).

Il seguente metodo si avvale dell'utilizzo di una scheda di rilevazione comportamentale per i suinetti in post-svezzamento, contenente dieci item che si riferiscono a comportamenti anomali. La compilazione della scheda è stata eseguita sempre nelle ore diurne dagli stessi operatori, con le stesse modalità operative.

Dopo aver individuato il gruppo di suini ed aver atteso qualche minuto affinché gli animali si tranquillizzassero e perdessero interesse verso l'operatore, si è proceduto alla osservazione dei comportamenti e della presenza delle eventuali lesioni per un periodo minimo di 15 minuti.

La scheda è composta da 10 domande e riporta i valori da assegnare in caso di presenza od assenza di anomalie comportamentali.

		osservato	non osservato
1	Ci sono gruppi di suini ammassati?	0	1,49
2	Esistono lesioni riferite all'eterolesionismo?	0	1,679
3	Sono presenti lesioni alla parte anteriore?	0	1,435
4	Sono presenti lesioni alla parte posteriore?	0	2,011
5	E' presente il Belly Nosing?	0	0,922
6	Sono presenti comportamenti competitivi?	0	1,353
7	Sono presenti lesioni alle orecchie?	0	1,714
8	Sono presenti lesioni alla coda?	0	1,394
9	E' presente il comportamento di mordicchiamento delle orecchie ?	0	1,243
10	E' presente il comportamento di mordicchiamento della coda?	0	1,504

La somma dei singoli valori viene definito come Global Score e permette di valutare lo stato di benessere dei suinetti nella fase in post svezzamento.

Tale valore può variare da 14.745, situazione di massimo benessere, a 0, situazione di minimo benessere.

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica dei risultati ottenuti è stata effettuata mediante utilizzo del pacchetto statistico SPSS. A seconda del piano sperimentale utilizzato sono state effettuate analisi della varianza (ANOVA) a una o due vie ed analisi delle misure ripetute.

Sui dati ottenuti è stata eseguita l'analisi statistica usando l'analisi della varianza (PROC. GLM) per valutare le differenze dei diversi comportamenti nelle diverse zone e la variazione dell'indice di occupazione in funzione dei parametri ambientali riscontrati (portata di ventilazione, temperatura ed umidità relativa).

Nel caso specifico del rating scale etologico comportamentale sono state calcolate le frequenze dei comportamenti e su queste è stato effettuato il test del chi quadrato.

RISULTATI

ATTIVITÀ ANTIRADICALICA GLOBALE DEL SANGUE

La prima fase dello studio relativo all'applicazione del test KRL nella specie suina ha riguardato la determinazione dei valori di riferimento dell'attività antiradicalica globale del sangue per animali di diverse classi di peso.

Si è proceduto alla scelta degli animali in buono stato di salute, dello stesso tipo genetico e con medesima alimentazione in modo da limitare l'effetto della variabilità genetica ed ambientale sull'attività antiradicalica globale del sangue. I risultati ottenuti sono stati successivamente sottoposti ad analisi statistica mediante Kolmogorov-Smirnov test, per testare la normalità della distribuzione. I valori di riferimento sono stati successivamente calcolati come media \pm 1,96 deviazione standard (Farver 1997).

Si riportano, come esempio, i valori di riferimento dell'attività antiradicalica globale del sangue, evidenziati nei suinetti maschi in post svezzamento (146 soggetti, peso compreso tra 10-47 kg).

Tabella 1 . Analisi descrittiva dell'età, peso degli animali ed attività antiradicalica globale del sangue, espressa come tempo di semi-emolisi di sangue ed emazie.

	Media \pm SE ¹	CV ² %	Mediana	Moda
Età, giorni	69 \pm 1	29.9	58	58
Peso, kg	22 \pm 0.9	47.0	20.1	29.00
HT ₅₀ , min				
- Sangue	76.46 \pm 0.72	11.41	75.58	76.59
- Emazie	55.42 \pm 0.48	10.57	54.98	58.06

¹Standard Error

²Coefficiente di Variazione

In tabella 2 sono riportati i valori normali per sangue ed emazie. Il range di valori "normali" per il sangue è compreso tra 59,34 e 93,60 HT₅₀ minuti, mentre il range di valori "normali" per le emazie risulta essere compreso tra 43,94 e 66,90 HT₅₀ minuti.

Tabella 2. Valori "normali" in suinetti maschi in post svezzamento

	HT ₅₀ , min
Sangue, min-max	59.34 – 93.60
Emazie, min-max	43.94 – 66.90

Nel sangue intero, il tempo di semi emolisi è superiore rispetto a quello riscontrato per le emazie. Questo dato è in relazione alla presenza di sistemi antiossidanti sia a livello extracellulare, che intracellulare, che contribuiscono in modo sinergico, al mantenimento dell'integrità delle membrane cellulari (Monaghan et al., 2009).

La fase successiva del progetto è stata relativa alla valutazione della sensibilità del test KRL a diverse condizioni:

1. momento fisiologico degli animali (effetto svezzamento);
2. tipo di stabulazione;
3. integrazioni alimentari;
4. stress indotto.

Nel corso del progetto sono state effettuate ulteriori analisi emato-chimiche e prove sulla sensibilità del test in relazione alla modalità di somministrazione di polifenoli nel mangime e all'utilizzo di arricchimento ambientale che non sono qui riportate in quanto non hanno fornito informazioni rilevanti e significative.

1. Effetto dello svezzamento

Il post svezzamento è una fase molto delicata in cui si verificano drastici cambiamenti fisiologici e morfologici, in modo particolare del tratto gastro-intestinale (Pluske et al., 1997; Owusu-Asiedu et al., 2003). Si evidenzia infatti come nel post svezzamento si possa verificare un aumento della produzione di radicali liberi (Sauerwein et al., 2005). Scopo del lavoro è stato valutare l'effetto dello svezzamento sull'attività antiradicalica globale del sangue in suinetti, misurata mediante test KRL.

Per la prova sperimentale sono stati utilizzati 40 suinetti maschi castrati, svezzati a 24 giorni di età e con un peso vivo medio di $7,1 \pm 0,8$ kg. Gli animali sono stati suddivisi in modo omogeneo in 4 box da 10 suinetti ciascuno e posti in sale ad ambiente controllato. Ad inizio prova, 15 e 60 giorni post svezzamento sono stati prelevati campioni di sangue da tutti i soggetti. Tali campioni, prelevati a digiuno dalla vena cava anteriore, sono stati raccolti in vacutainer da 10 ml contenente EDTA (Venoject®, Terumo Europe NV, Leuven, Belgio) e messi nel ghiaccio in attesa delle analisi con KRL test. Le analisi sono state eseguite entro 24 ore dalla procedura di campionamento.

Si evidenzia una diminuzione ($P < 0,001$) dell'attività antiradicalica globale del sangue intero da 102,8 min allo svezzamento nei suinetti sotto scrofa a 86,4 min e a 73,4 min a 15 e 60 giorni post svezzamento (Figura 12). Un risultato analogo è stato ottenuto sull'attività antiradicalica delle emazie. Si

osserva infatti come la capacità antiradicalica nelle emazie diminuisca ($P < 0,001$) da 70,4 a 59 min allo svezzamento e sia compresa tra $53,5 \pm 4,8$ min a 15 e 60 giorni post svezzamento (Figura 13).

Figura 12. Attività antiradicalica globale del sangue intero in funzione del tempo dallo svezzamento

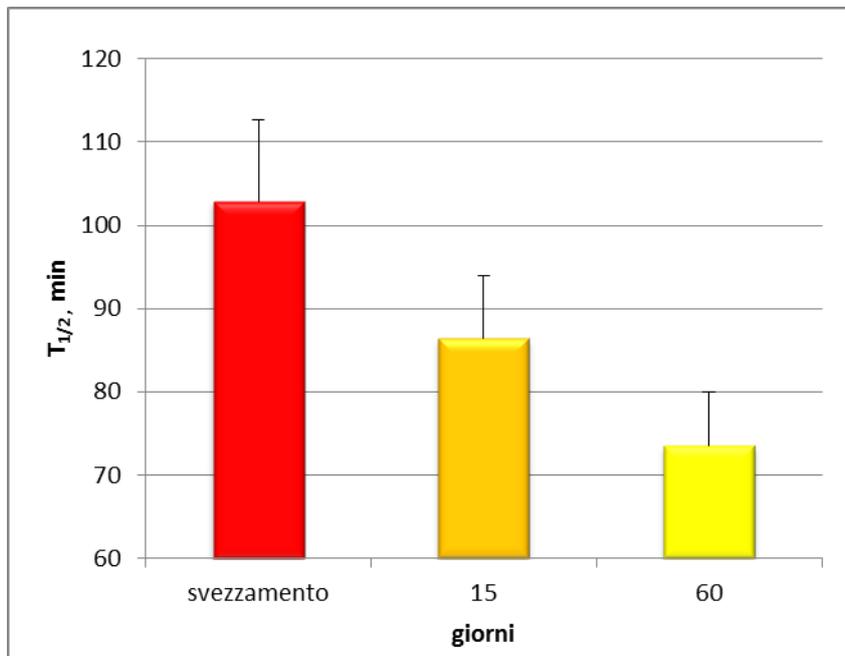
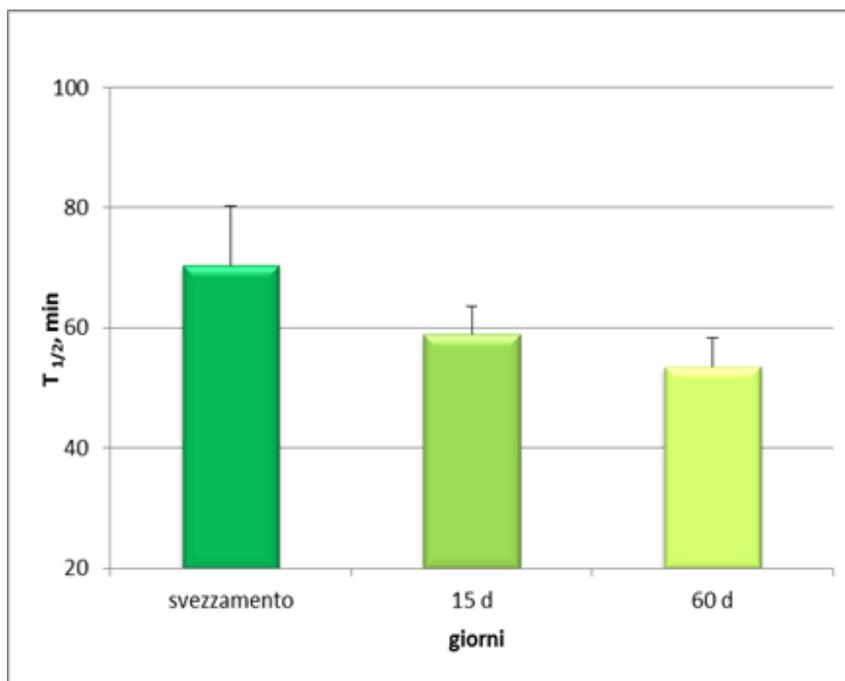


Figura 13. Attività antiradicalica globale delle emazie in funzione del tempo dallo svezzamento



Questo risultato indica come il post svezzamento sia un momento critico per l'insorgenza di stress ossidativo che può facilmente portare ad un peggioramento delle condizioni di benessere degli animali. Come evidenziato in un nostro precedente studio, l'integrazione della dieta con antiossidanti di origine naturale permette di migliorare le performance di crescita e lo stato ossidativo nei suinetti (Corino et al., 2007). La somministrazione di antiossidanti nel periodo del post svezzamento sembra quindi poter contrastare lo stress ossidativo nel suinetto facilitando il superamento di una delle fasi più critiche dell'allevamento suino.

2. Effetto di diverse condizioni di allevamento

La relazione tra benessere e le diverse condizioni di allevamento è diventata un'area di estremo interesse (EFSA 2005). Tra le condizioni di allevamento il tipo di pavimentazione è un fattore determinante per differenti motivazioni tra cui l'insorgenza di patologie podali (Gillman et al., 2009) in grado di influenzare il benessere, le performances e il comportamento degli animali (Ruiterkamp 1987). In particolare è stato evidenziato come una pavimentazione totalmente fessurata porti ad una diminuzione del movimento degli animali con aumento del tempo trascorso in decubito laterale o sternale (Rossi et al., 2008). Inoltre Nanni Costa et al., (2007) ha evidenziato un maggior stress pre-macellazione in suini allevati su pavimento fessurato rispetto al pavimento pieno.

Per tale prova sono stati scelti 24 suini maschi castrati in buono stato di salute con un peso vivo compreso tra gli 80 e i 120 kg: metà dei suini era stabulata in box con pavimento pieno e metà in box con pavimento totalmente fessurato.

I campioni di sangue prelevati a digiuno dalla vena cava anteriore, sono stati raccolti in vacutainer da 10 ml contenente EDTA (Venoject ®, Terumo Europe NV, Leuven, Belgio) e messi nel ghiaccio in attesa di analisi con test KRL che sono state eseguite entro 24 ore dalla procedura di campionamento.

I risultati relativi alla capacità antiradicalica globale del sangue intero non hanno evidenziato differenze ($P=0,320$) in relazione alla stabulazione su diverso tipo di pavimentazione (Figura 14).

A livello di emazie si nota invece come l'attività antiradicalica globale risulti significativamente più elevata ($P=0,010$) negli animali allevati su pavimento pieno (Figura 15).

Il valore dell'attività antiradicalica delle emazie è considerato un indice delle difese antiossidanti intracellulari ed è importante per conoscere il bilancio tra produzione di sostanze ossidanti e loro neutralizzazione nel medio/lungo periodo, considerando che l'emivita delle emazie nel suino è di 60-85 giorni (Pastorelli et al., 2009).

Figura 14. Attività antiradicalica globale del sangue intero in funzione del tipo di pavimentazione

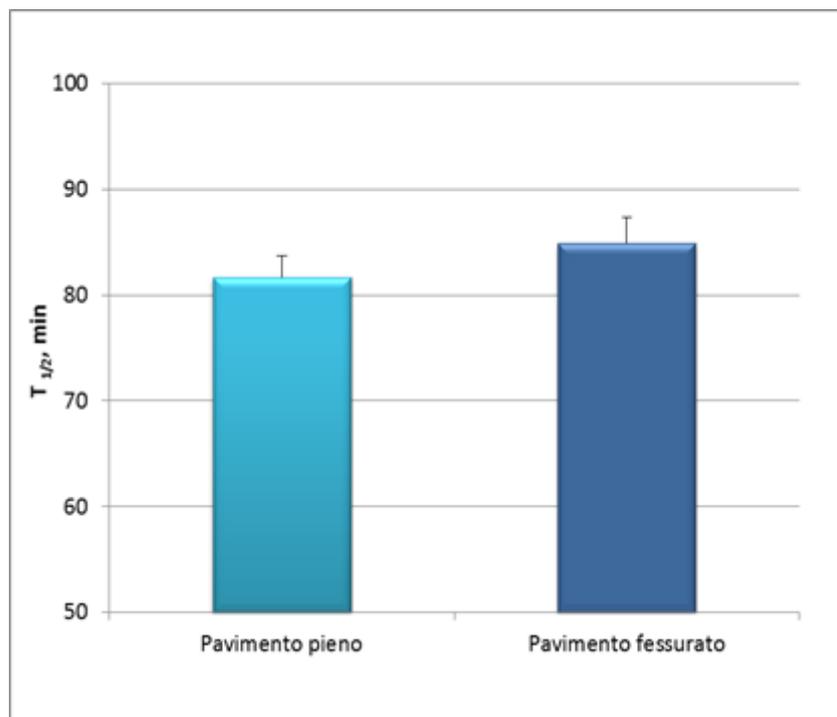
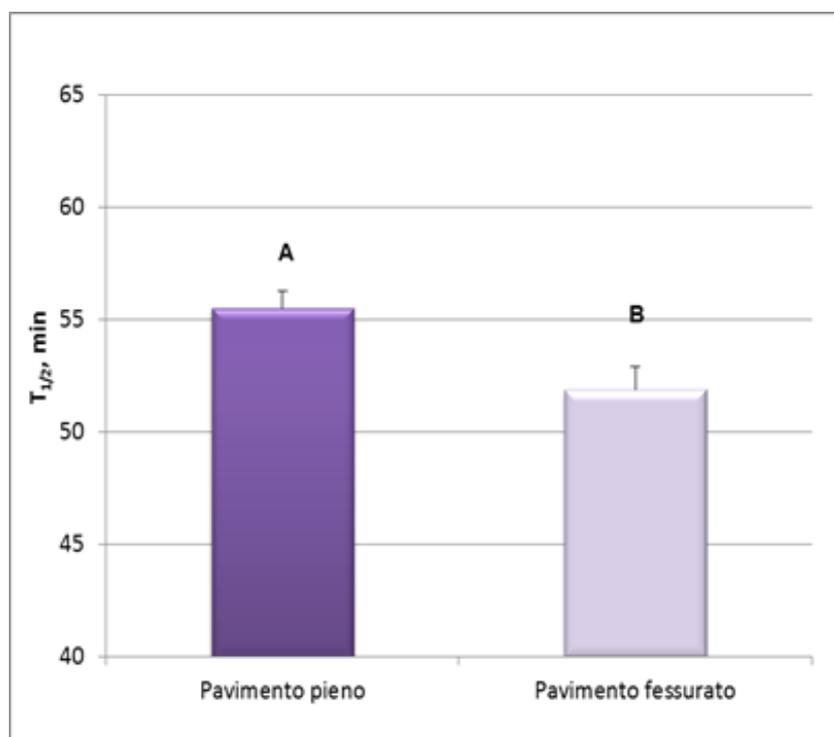


Figura 15. Attività antiradicalica delle emazie in funzione del tipo di pavimentazione



^{A, B} P < 0,01

Questo risultato ci permette di ipotizzare come la presenza di uno stress persistente, dovuto alla permanenza degli animali su pavimento totalmente fessurato, possa causare una diminuzione della capacità antiradicalica delle emazie tale da renderle più predisposte al danno ossidativo. Lo stress cronico può infatti portare ad una depauperazione delle riserve antiossidanti con conseguenze negative sullo stato di salute degli animali (Brambilla et al., 2002).

3. Effetto dell'integrazione alimentare con sostanze antiossidanti

Allo svezzamento i suinetti vanno incontro ad un calo di α -tocoferolo a livello sierico che può prolungarsi per oltre due settimane principalmente per due cause: la bassa ingestione di alimenti e la ridotta produzione pancreatica dell'enzima carbossilester idrossilasi, enzima che influenza direttamente l'assorbimento della Vitamina E e ne condiziona la biodisponibilità (Vincenzi et al., 2005). La vitamina E è fondamentale anche per lo sviluppo del sistema immunitario (Jensen, 1988) ed una deficienza di tale molecola nel post svezzamento predispone l'animale all'insorgenza di numerose malattie tra le quali enteriti ed infezioni da *E. coli* (Pehrson et al., 2001).

Altre patologie sembrano essere associate ad una situazione di stress ossidativo dell'organismo, con insorgenza di polmoniti e sepsi (Deaton et al., 2004, Lykkesfeldt et al., 2007). Anche Sauerwein (2005) ha dimostrato che lo svezzamento è spesso accompagnato da stress ossidativo dell'organismo, che porta ad uno stato di immunodepressione (Aurousseau, 2002; Favier, 2003) e a morti improvvise. Allo svezzamento il livello sierico di Vitamina E scende a livelli critici e questo declino è spesso associato all'esordio di sintomi carenziali (Lauridsen, 2005). Pertanto è fondamentale non trascurare gli effetti derivanti dai bassi livelli di Vitamina E nei suinetti nei primi mesi di vita, in quanto, carenze in questa fase, riducono le già scarse difese antiossidanti naturali. Lo stress ossidativo può essere quindi considerato come concausa dell'insorgenza di una condizione patologica che, oltre a compromettere le produzioni, è in generale dannosa per lo stato di benessere dell'animale.

In questa fase si rende quindi necessaria un'integrazione della dieta con sostanze antiossidanti, quali Vitamina E o estratti naturali, per sfruttare potenziali sinergie.

3.1 Vitamina E

Per la prova sperimentale sono stati utilizzati 80 suinetti metà maschi metà femmine del peso iniziale di 7 kg circa suddivisi, in modo uniforme in base al peso vivo ed al sesso, in 2 gruppi sperimentali di 40 capi ciascuno. Gli animali sono stati alimentati *ad libitum* per tutto il periodo con due diete sperimentali isoenergetiche ed isoproteiche. Il gruppo controllo (C) ha ricevuto un dosaggio base di 175 mg/kg di

Vitamina E mentre il gruppo trattato (Vit E) un mangime integrato con il dosaggio base più 54 mg/kg di Vitamina E. La prova ha avuto una durata di 60 giorni. Gli animali sono stati pesati ad inizio prova, a 15 e 60 giorni per il calcolo dell'accrescimento medio giornaliero (AMG) e alle stesse scadenze è stato effettuato un prelievo ematico su 10 soggetti per trattamento. I campioni di sangue prelevati a digiuno dalla vena cava anteriore, sono stati raccolti in vacutainer da 10 ml contenente EDTA o vuote (Venoject®, Terumo Europe NV, Leuven, Belgio) e messi nel ghiaccio in attesa di analisi con test KRL che sono state eseguite entro 24 ore dalla procedura di campionamento. I campioni di siero sono stati utilizzati per la determinazione della concentrazione dell'aptoglobina sierica.

I risultati relativi alle performance di crescita degli animali non hanno mostrato differenze tra i 2 gruppi sperimentali. Il peso medio degli animali prelevati ad inizio prova si è attestato sui 7,2 kg, a 15 giorni sui 9,5 kg e a 60 giorni sui 28,6 kg. L'AMG è risultato di 414 g/d. L'attività antiradicalica del sangue intero, riportata in Figura 16, è risultata significativamente superiore ($P=0,032$) nel gruppo integrato con Vitamina E rispetto al controllo. Un risultato analogo si evidenzia nelle emazie con un valore maggiore ($P=0,010$) nel gruppo integrato (Figura 17). Non si riscontrano differenze in relazione al tempo di prelievo od interazioni fra tempo e trattamento (Fig. 16 e 17).

Figura 16. Attività antiradicalica del sangue intero in suinetti in funzione del trattamento alimentare e del tempo di prelievo

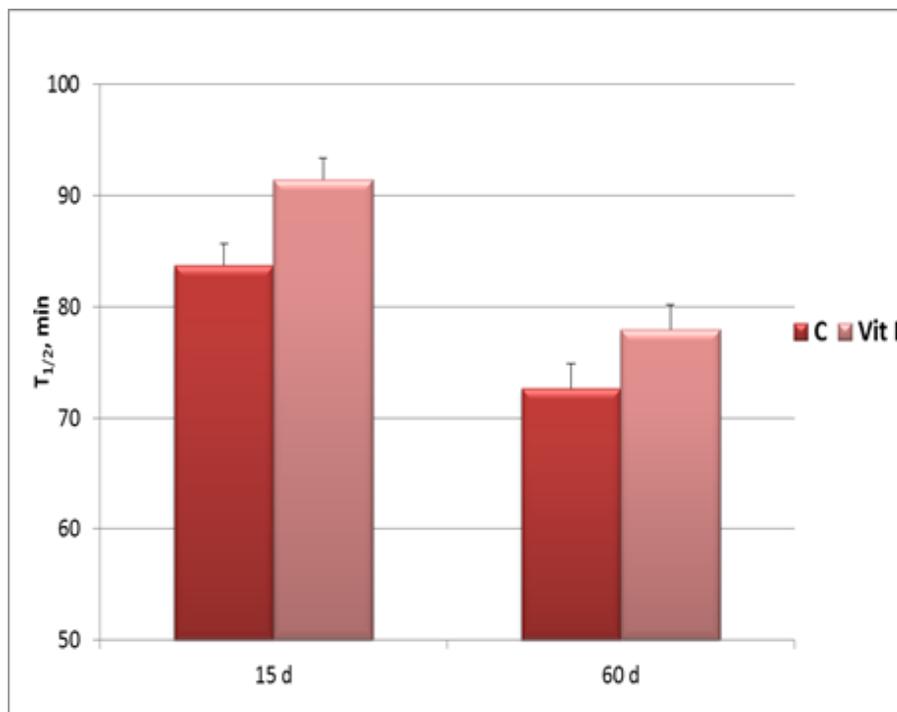
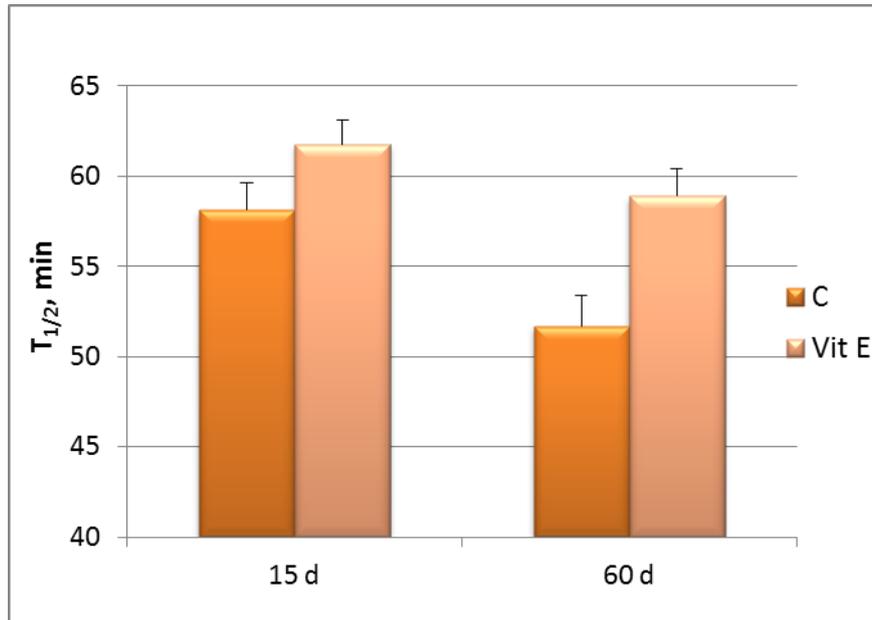
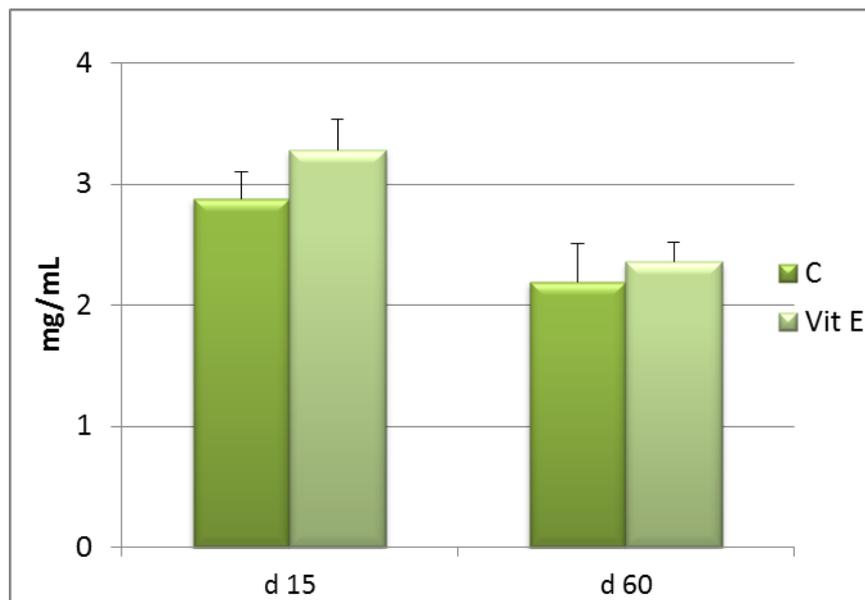


Figura 17. Attività antiradicalica delle emazie in suinetti in funzione del trattamento alimentare e del tempo di prelievo



La concentrazione di aptoglobina sierica non presenta differenze significative in relazione al trattamento alimentare. Si evidenzia invece una diminuzione ($P=0,027$) in relazione al tempo di prelievo come riportato in Figura 18.

Figura 18. Concentrazione di aptoglobina sierica in suinetti in funzione del trattamento alimentare e del tempo di prelievo



La maggior attività antiradicalica del sangue intero e delle emazie, evidenziata nel gruppo integrato, indicherebbe una maggior resistenza degli animali allo stress ossidativo. Il livello di Vitamina E utilizzato non è stato in grado di ridurre la concentrazione di aptoglobina sierica. Møller e Lauridsen (2006) riportano come l'integrazione della dieta con 300 mg/kg di Vitamina E non abbia portato ad una riduzione della produzione di markers infiammatori quali citochine ed eicosanoidi. Si evidenzia invece una diminuzione dell'aptoglobina in relazione al tempo di prelievo che indica una maggior presenza di patologie infiammatorie nell'immediato post svezzamento.

3.2 Antiossidanti naturali

L'unione europea, con il bando del gennaio 2006 sull'impiego di antibiotici ad uso auxinico, ha fatto sì che in ambito scientifico la ricerca si sia orientata sul possibile utilizzo di sostanze naturali in grado di influenzare le performance e migliorare il benessere. Ad alcuni estratti di origine naturale si attribuiscono importanti funzioni antiossidanti, immunostimolanti ed antibatteriche dovute alla presenza di diversi principi attivi che rientrano nella categoria dei polifenoli. Tra i polifenoli il verbascoside, un fenilpropanoide glicoside (PPG) presente in molte piante medicinali, mostra numerose attività biologiche d'interesse (Manach et al., 2004). In uno studio condotto su polifenoli di origine naturale ed altri composti per valutare la loro attività antiossidante verso l'ossidazione di proteine indotta da radicali perossidi, il verbascoside risulta il composto con maggiore attività (Salvi et al., 2002). In un recente studio è stato evidenziato come un estratto naturale titolato con fenilpropanoidi glicosidi espressi come verbascoside abbia mostrato un'attività antiossidante superiore al verbascoside e teupolioside derivati da colture cellulari (Rossi et al., 2009). Si è deciso quindi di integrare il mangime dei suini con tale estratto naturale (1 kg/t alimento) in modo da apportare 5 mg/kg di mangime di verbascoside.

Per la prova sperimentale sono stati utilizzati 40 suinetti maschi castrati del peso iniziale di circa 7 kg marchiatosi individualmente e ripartiti in modo uniforme in base al peso vivo nei 2 gruppi sperimentali differenziati per l'integrazione nel mangime con un estratto naturale. Gli animali sono stati alimentati *ad libitum* per tutto il periodo sperimentale di 150 giorni con diete isoenergetiche ed isoproteiche. Nel corso della prova sono stati rilevati il peso dei suini a 0, 15, 60, 90, 150 giorni, il consumo alimentare, il tasso di mortalità e gli interventi terapeutici. In corrispondenza delle pesate sono stati effettuati 5 prelievi ematici da 12 soggetti per gruppo per l'analisi dei seguenti parametri: aptoglobina, cortisolo ematico, bilirubina, AST e capacità antiradicalica globale del sangue.

Le performance di crescita, i trattamenti terapeutici ed il tasso di mortalità non hanno mostrato differenze tra gruppi. Il peso medio finale degli animali si è attestato sui 97 kg, con un incremento

medio giornaliero di 598 g/d. La conversione alimentare è risultata essere di 2,4 e 2,5 rispettivamente nel gruppo controllo e nel trattato. In tabella 3 sono riportati i parametri ematici degli animali.

Tabella 3. Parametri ematici in relazione al trattamento alimentare ed ai tempi di prelievo

	Trattamento		P		
	Controllo	PPG	Tratt	T	T*Tratt
Aptoglobina, mg/mL					
15 d	2.1 ± 0.4	2.4 ± 0.4	0.403	<0.001	0.948
60 d	1.9 ± 0.3	2.1 ± 0.3			
90 d	1.3 ± 0.3	1.3 ± 0.2			
150 d	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1			
Cortisolo, µg/dL					
15 d	3.9 ± 0.4	3.7 ± 0.4	0.553	0.286	0.996
60 d	2.5 ± 0.3	2.3 ± 0.3			
90 d	2.3 ± 0.2	2.1 ± 0.2			
150 d	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.2			
Bilirubina, µmoli/L					
15 d	4.6 ± 0.5	4.1 ± 0.5	0.637	0.850	0.256
60 d	5.1 ± 0.4	4.2 ± 0.4			
90 d	3.0 ± 0.2	3.9 ± 0.3			
150 d	4.7 ± 0.6	4.5 ± 0.6			
AST, UI/L					
15 d	54.0 ± 3.7	41.3 ± 3.2	0.102	0.006	0.116
60 d	40.9 ± 2.8	40.4 ± 2.5			
90 d	39.9 ± 2.9	38.3 ± 2.6			
150 d	41.1 ± 3.0	38.7 ± 2.7			

La concentrazione di aptoglobina sierica e l'AST hanno evidenziato una diminuzione in relazione al tempo di prelievo. Non si rilevano invece differenze in relazione al trattamento alimentare. Il cortisolo ematico e la bilirubina non presentano differenze in relazione al tempo di prelievo e al trattamento alimentare.

In Figura 19 è riportata l'attività antiradicalica globale del sangue intero che ha mostrato un aumento tendenzialmente significativo (P=0,09) nei suini alimentati con estratto naturale. Non si evidenzia invece nessuna differenza significativa a livello di emazie (Fig. 20).

Figura 19. Attività antiradicalica globale del sangue intero in suinetti in funzione del trattamento alimentare e del tempo di prelievo

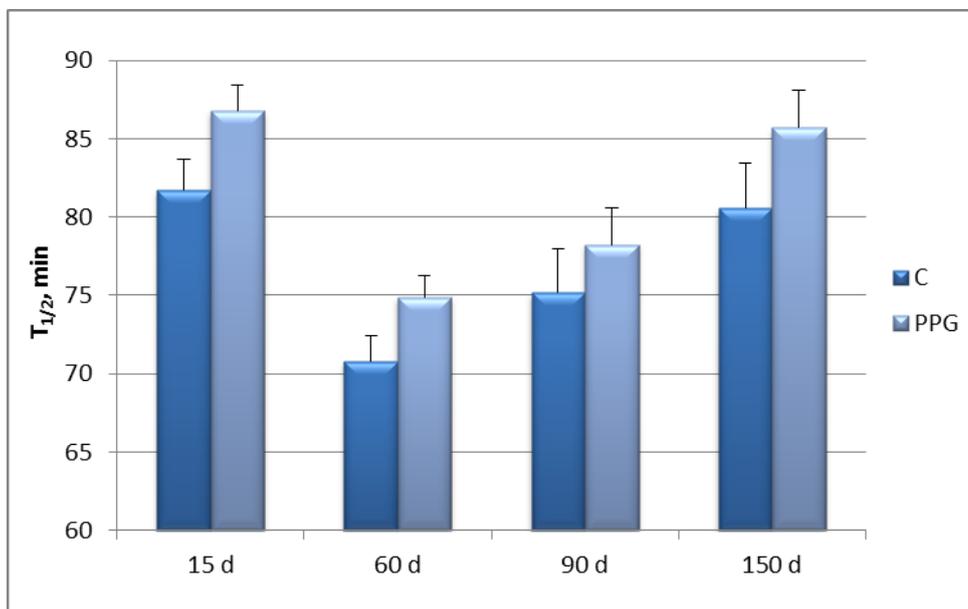
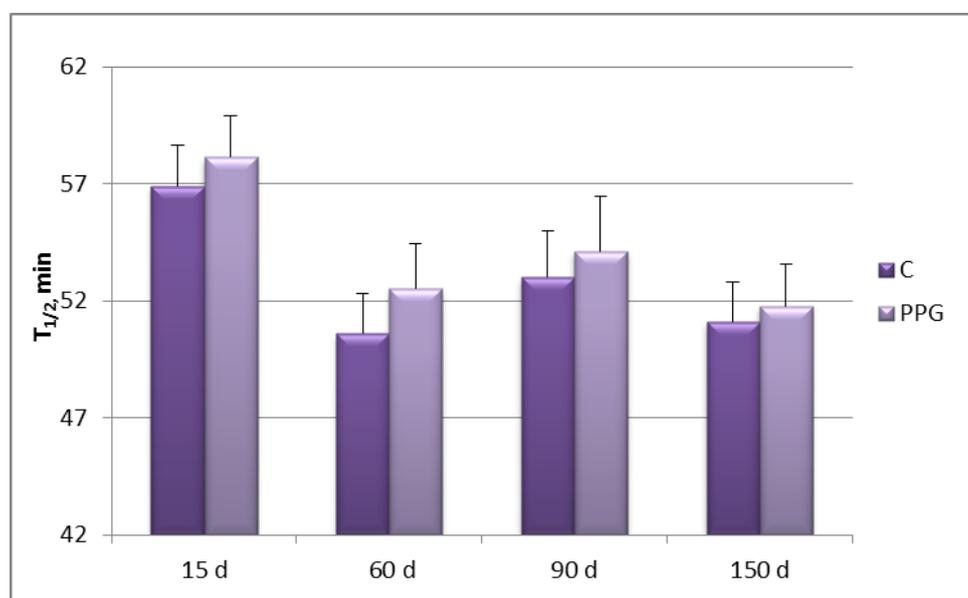


Figura 20. Attività antiradicalica delle emazie in suinetti in funzione del trattamento alimentare e del tempo di prelievo



I risultati relativi alle performance di crescita sono in accordo con quanto evidenziato da Neill et al., (2006). L'andamento dell'aptoglobina è in accordo con Sauerwein et al., (2005) che riporta una sua concentrazione massima intorno alle 5 settimane di vita e successiva riduzione a livello sierico nelle

settimane successive. Tale logica vale anche per l'AST la cui concentrazione è massima per entrambi i trattamenti a + 15 giorni, momento in cui i processi infiammatori sono più manifesti.

Si rileva inoltre un'elevata sensibilità del test KRL nell'evidenziare una capacità antiradicalica globale del sangue tendenzialmente più elevata nel gruppo alimentato con estratti naturali.

4. Effetto dello stress indotto

Le condizioni ambientali sono determinanti per il benessere dei suini. Tra le condizioni ambientali che possono essere causa di stress per i suini ricordiamo:

- la formazione di nuovi gruppi di animali, che comporta la comparsa di lotte gerarchiche e comportamenti agonistici per instaurare nuove gerarchie;
- lo spazio disponibile per animale.

Il Decreto Legislativo n. 53, 20/02/2004 (attuazione Direttiva 2001/93/EC che stabilisce le norme minime sulla protezione dei suini) riporta delle indicazioni riguardo ai punti sopra elencati.

4.1 Rimescolamento

Sono stati effettuati diversi studi che hanno messo in evidenza come il rimescolamento dei soggetti comporti stress per l'animale. Heetkamp et al., (1995) hanno calcolato che c'è un aumento del fabbisogno energetico del 1,3%, effetto dei combattimenti tra i suinetti. In generale, il rimescolamento porta a scarso benessere provocando stress, evidenziato da elevati livelli di cortisolo nei suinetti svezzati il giorno del raggruppamento (Pedersen, 1993).

Si è quindi voluto valutare la sensibilità del test KRL nell'evidenziare uno stress indotto dal rimescolamento di suinetti alimentati con dieta controllo ed integrata con estratto naturale titolato in verbascoside.

Nella prova sono stati utilizzati 56 suinetti, marchiati individualmente, del peso iniziale di circa 5 kg, suddivisi in 4 box, di cui due alimentati con dieta controllo e due con dieta integrata con estratti naturali, titolati in verbascoside (5 mg/kg alimento). A 37 giorni dall'inizio della prova e nell'ambito dello stesso trattamento alimentare, la metà dei suinetti di ogni gruppo è stato sostituito con animali provenienti dall'altro box in modo da effettuare un vero e proprio rimescolamento degli animali. Nel corso della prova sono stati effettuati i seguenti rilievi: peso dei suinetti a 0, 37 e 59 giorni, consumo alimentare di gruppo ed interventi terapeutici.

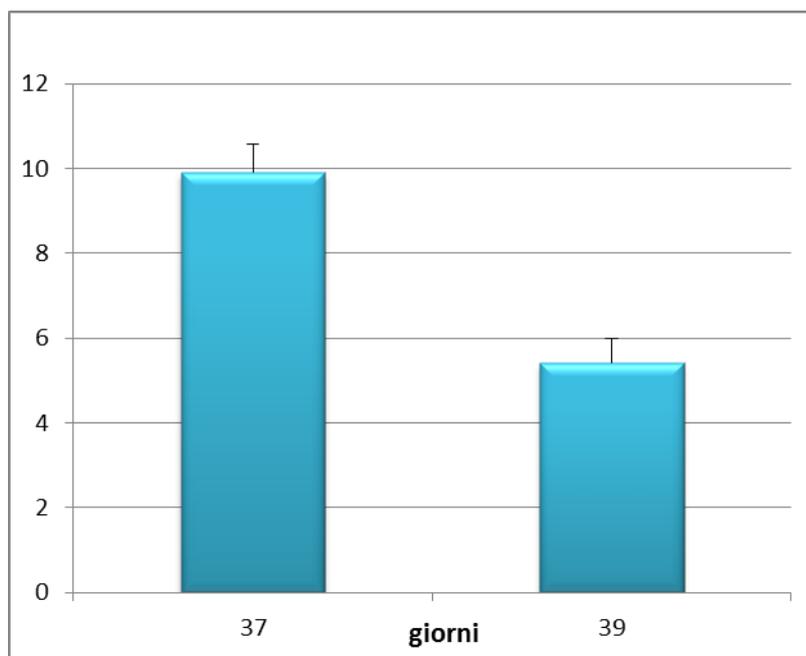
Una settimana prima ed una settimana dopo il rimescolamento degli animali sono stati effettuati a giorni alterni 8 rilevazioni comportamentali, mediante Rating Scale etologico comportamentale. Durante il corso della sperimentazione sono stati effettuati 2 prelievi ematici a 37 (giorno del

rimescolamento) e 39 giorni da 14 soggetti per trattamento, per l'effettuazione della capacità antiradicalica globale del sangue, livello di aptoglobina sierica e cortisolo.

Le performance di crescita degli animali non hanno mostrato differenze significative tra gruppi sperimentali. Il peso medio a 37 giorni post svezzamento è di 15,1 kg per il controllo e 16,4 kg per il trattato, per arrivare rispettivamente a 28,5 kg e 30,4 kg a fine prova. L'accrescimento medio giornaliero risulta numericamente superiore nel gruppo trattato (637 g/d *vs* 593 g/d), con un indice di conversione alimentare migliore nel gruppo integrato con antiossidanti (1,53 *vs* 1,22).

Il global score relativo al benessere è risultato essere inferiore ($P < 0,001$) dopo stress indotto da rimescolamento come riportato in Figura 21. Non si sono riscontrate variazioni in funzione del trattamento alimentare.

Figura 21. Global Score in relazione al rimescolamento dei suinetti



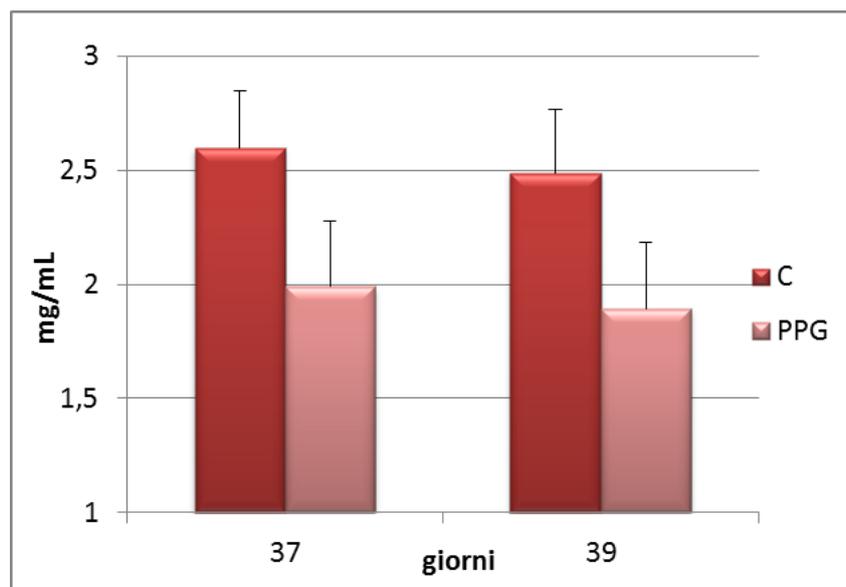
In tabella 4 sono riportate le anomalie comportamentali riscontrate prima (T0) e dopo il rimescolamento (T1) dei soggetti. Dopo il rimescolamento dei suinetti si evidenzia un aumento significativo delle lesioni da eterolesionismo (da 0% al 50%). Si è osservato inoltre un aumento delle lesioni sia sulla parte anteriore (da 25% a 75%) che posteriore dell'animale (da 12,5% a 100%) ed un aumento delle lesioni alle orecchie (da 50% a 100%). Non si riportano differenze significative per le altre anomalie comportamentali prese in esame.

Tabella 4. Anomalie comportamentali in funzione dello stress indotto dal rimescolamento

		% T0	% T1	<i>P</i>
1	Ci sono gruppi di suini ammassati?	0	0	1.000
2	Esistono lesioni riferite all'eterolesionismo?	0	50	0.021
3	Sono presenti lesioni alla parte anteriore?	25	75	0.046
4	Sono presenti lesioni alla parte posteriore?	12.5	100	<0.001
5	E' presente il Belly Nosing?	62.5	25	0.131
6	Sono presenti comportamenti competitivi?	12.5	0	0.302
7	Sono presenti lesioni alle orecchie?	50	100	0.021
8	Sono presenti lesioni alla coda?	0	25	0.131
9	E' presente il comportamento di mordicchiamento delle orecchie?	62	75	0.590
10	E' presente il comportamento di mordicchiamento della coda?	0	0	1.000

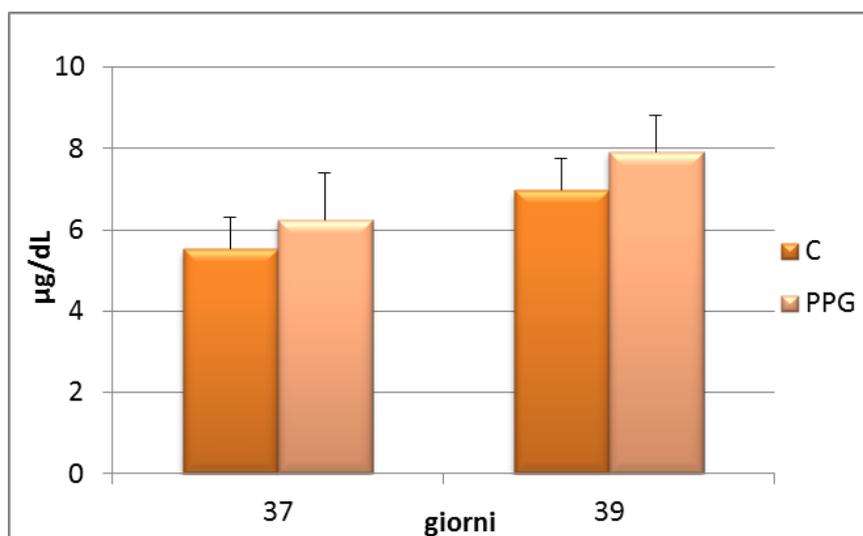
Dalla Figura 22 si rileva che i livelli di aptoglobina sierica non evidenziano variazioni legate al rimescolamento dei soggetti ($P=0,713$) mentre i suinetti alimentati con antiossidanti naturali presentano livelli di aptoglobina sierica inferiori ($P=0,035$) rispetto al controllo.

Figura 22. Livelli di aptoglobina sierica in funzione del trattamento alimentare e dello stress indotto dal rimescolamento



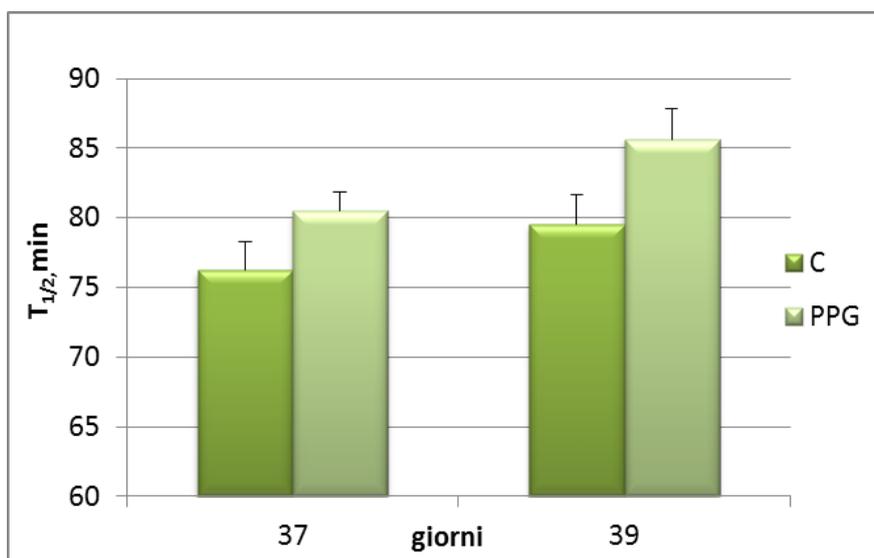
Il livello di cortisolo ematico non presenta variazioni significative in relazione al trattamento alimentare ($P=0,370$). Vi è invece un aumento tendenzialmente significativo ($P=0,091$) di tale parametro dopo il rimescolamento dei suinetti (Figura 23).

Figura 23. Livelli di cortisolo ematico in funzione del trattamento alimentare e dello stress indotto dal rimescolamento



Si evidenzia un aumento significativo della capacità antiradicalica globale del sangue intero in relazione al rimescolamento ($P=0,012$) e all'integrazione della dieta con antiossidanti vegetali ($P=0,037$). Non si evidenzia un'interazione significativa ($P=0,644$) dei due fattori presi esame (Figura 24).

Figura 24. Capacità antiradicalica globale del sangue intero in funzione del trattamento alimentare e dello stress indotto dal rimescolamento



I risultati relativi alle performance di crescita sono in accordo con Chung et al., (1992) che ha riportato come la somministrazione di livelli crescenti di D- α tocoferolo e α tocoferil acetato non abbia portato a migliori performance di crescita. I dati relativi all'indice di conversione alimentare sono in accordo con Corino et al., (2007) che riportano migliori risultati in suinetti alimentati con dieta integrata con antiossidanti naturali.

Dai risultati ottenuti dal Rating Scale etologico comportamentale si evince che il rimescolamento causa nei suinetti uno stato di scarso benessere come riportato da De Groot et al., (2001). Questi dati sono in accordo con D'Eath et al., (2005) che riportano un aumento di lesioni dovute a combattimenti (+2,3%) in suinetti rimescolati a 20 giorni post svezzamento. Viene quindi confermato che la specie suina forma relazioni sociali molto stabili (Beilharz, 1967; Ewbank, 1972) e se alterata la gerarchia tramite rimescolamento si ha un'alta percentuale di anomalie comportamentali.

L'aptoglobina sierica non presenta differenze in relazione al rimescolamento dei suinetti, in accordo con altri studi (Merlot et al., 2004) che riportano come cambiamenti nelle gerarchie sociali nel post svezzamento non siano in grado di indurre alterazione nel funzionamento del sistema immunitario. Si evidenzia invece una riduzione dell'aptoglobina sierica negli animali trattati con antiossidanti naturali che è peraltro da mettersi in relazione all'attività antinfiammatoria delle molecole.

I risultati relativi al cortisolo sono in accordo con gli studi di Pedersen et al., (1993) dove sono stati dimostrati elevati livelli di cortisolo in suinetti svezzati in relazione alla formazione di nuovi gruppi. Anche Merlot et al., (2004) hanno provato che il rimescolamento dei suinetti allo svezzamento aumenta la concentrazione salivare di cortisolo in relazione a comportamenti agonistici.

Si evidenzia un miglioramento della capacità antiradicalica del sangue negli animali trattati con antiossidanti vegetali. Questo dato è in accordo con Corino et al., (2007) che evidenziano una miglior stabilità ossidativa del siero, con minor produzione di ROS (reactive oxygen specie) in animali la cui dieta è stata integrata con antiossidanti naturali. Anche Guillou et al., (2009) riportano che l'integrazione dietetica con Vitamina E e selenio in suinetti in post svezzamento determina un aumento della capacità antiradicalica globale del sangue.

Si osserva inoltre un aumento della capacità antiradicalica totale del sangue dopo il rimescolamento dei suinetti, dovuto verosimilmente alla mobilitazione delle riserve antiossidanti per far fronte ad uno stress. Lo stesso risultato è stato osservato in conigli e cavalli sottoposti ad intenso esercizio fisico (Alipour et al., 2006; Wieslaw 2010). A fine prova infatti si osserva un ritorno dei valori dell'attività antiradicalica globale sovrapponibili a quelli ottenuti prima dello stress indotto.

4.2 Riduzione dello spazio disponibile

Lo spazio disponibile per animale è un parametro di fondamentale importanza per garantire il benessere nella specie suina. La normativa a livello comunitario sul benessere animale impone infatti uno spazio minimo per le diverse classi di peso (D.L. 53/04). Per i suinetti di peso compreso tra i 10-20 kg tale limite è fissato a 0,20 m² per capo.

Una diminuzione dello spazio disponibile può portare all'insorgenza di comportamenti competitivi ed aggressivi, con conseguente riduzione del benessere (Curtis et al., 1996). Altri autori hanno evidenziato che uno spazio inadeguato porta alla diminuzione delle performance di crescita dei suinetti nel post-svezzamento (Yen and Pond 1987; Wolter et al., 2000).

L'obiettivo è stato quello di evidenziare gli effetti sul benessere, valutato misurando l'attività antiradicalica globale del sangue, in suinetti nel post svezzamento alimentati con dieta controllo o integrata con estratti naturali e sottoposti a stress indotto dalla riduzione dello spazio disponibile.

Per la prova sperimentale sono stati utilizzati 26 suinetti femmine del peso iniziale di 9 kg circa suddivisi in 2 gruppi sperimentali alimentati con dieta controllo ed integrata con estratti naturali, titolati in verbascoside (5 mg/kg alimento). Gli animali sono stati alimentati *ad libitum* per tutto il periodo sperimentale. La prova ha avuto una durata di 49 giorni. A 21 giorni dall'inizio della prova, lo spazio a disposizione dei suinetti è stato ridotto da 0,24 a 0,16 m²/capo. Dopo 14 giorni trascorsi in box con spazio ridotto, gli animali sono stati riportati alle condizioni iniziali, fino a fine prova. Ad inizio prova, 21, 25, 35 e 49 giorni è stato effettuato un prelievo ematico su 11 soggetti per trattamento. I campioni di sangue intero sono stati utilizzati per la determinazione dell'attività antiradicalica globale del sangue mediante il KRL test.

Una settimana prima ed una settimana dopo la riduzione dello spazio disponibile sono stati effettuati a giorni alterni 8 rilevazioni comportamentali, mediante Rating Scale etologico comportamentale.

L'attività antiradicalica del sangue intero è riportata in Figura 25. Si evidenzia un effetto significativo del tempo (P=0,05). Non si evidenzia un effetto del trattamento alimentare (P=0,292) e dell'interazione tra i due fattori (P=0,592). I contrasti ortogonali hanno mostrato una diminuzione della capacità antiradicalica del sangue in relazione alla riduzione dello spazio (21d *vs* 25 d P=0,023).

L'attività antiradicalica delle emazie è riportata in Figura 26. Si evidenzia un effetto significativo del tempo di prelievo (P=0,004). Non si osserva un effetto significativo del trattamento alimentare (P=0,596) e dell'interazione tra i due fattori (P=0,133). I confronti ortogonali hanno evidenziato una diminuzione della capacità antiradicalica delle emazie in relazione alla riduzione dello spazio (21d *vs* 25 d P < 0,001; 21d *vs* 35 d P=0,004).

Figura 25. Attività antiradicalica del sangue intero in funzione del trattamento alimentare e del tempo di prelievo

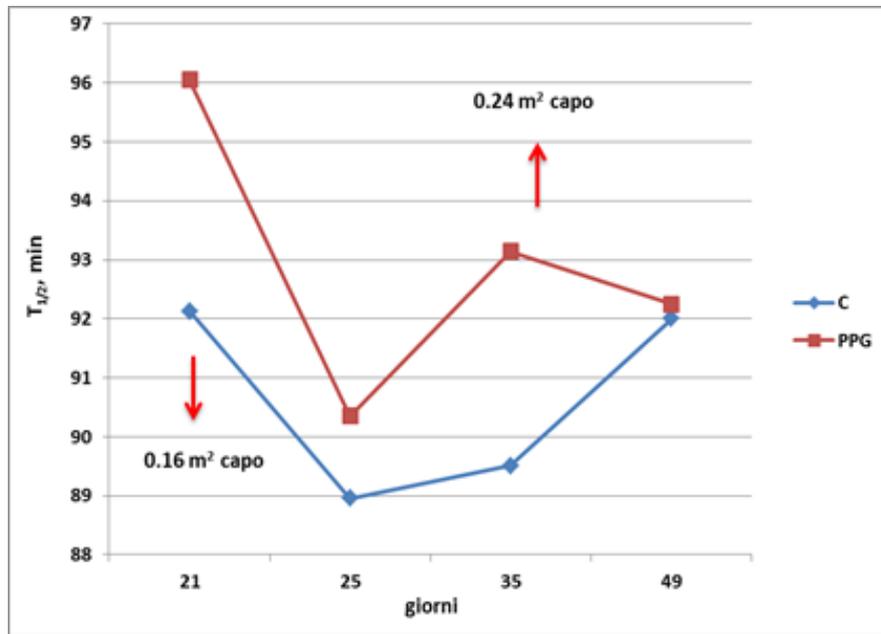
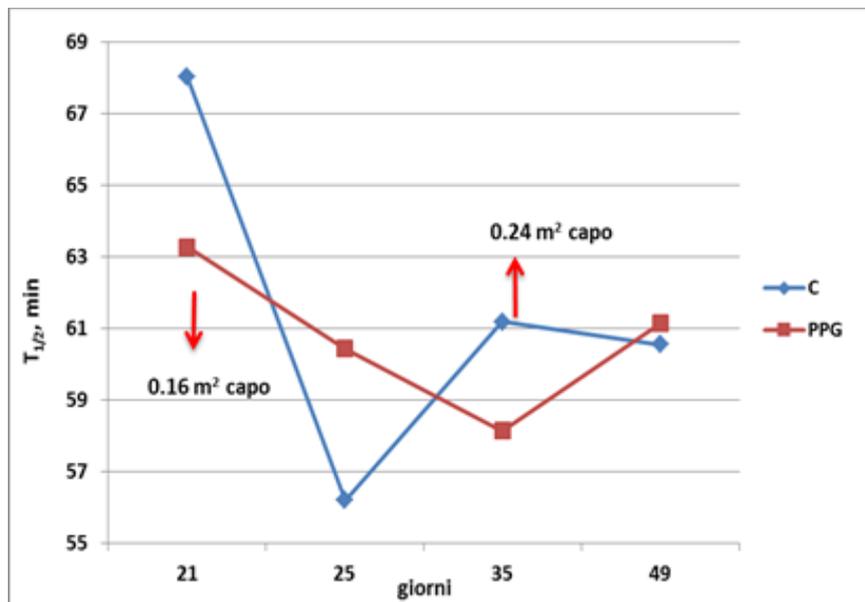


Figura 26. Attività antiradicalica delle emazie in funzione del trattamento alimentare e del tempo di prelievo



Il global score relativo al benessere ha mostrato un valore pari a $12,95 \pm 0,72$ prima dello stress indotto dalla riduzione dello spazio disponibile. Questo score non presenta differenze ($P=0,594$) dopo la

riduzione dello spazio e si è attestato a $12,33 \pm 0,82$. In tabella 5 sono riportate le anomalie comportamentali riscontrate prima e dopo la riduzione dello spazio disponibile. Si può osservare come non si evidenzino differenze per le anomalie comportamentali prese in esame, prima e dopo la riduzione dello spazio disponibile.

Tabella 5. Frequenza delle anomalie comportamentali in funzione dello stress indotto dalla riduzione dello spazio disponibile

		% T0	% T1	P
1	Ci sono gruppi di suini ammassati?	0	0	1.000
2	Esistono lesioni riferite all'eterolesionismo?	0	0	1.000
3	Sono presenti lesioni alla parte anteriore?	25	0	0.429
4	Sono presenti lesioni alla parte posteriore?	0	0	1.000
5	E' presente il Belly Nosing?	0	12.5	0.285
6	Sono presenti comportamenti competitivi?	0	0	1.000
7	Sono presenti lesioni alle orecchie?	75	25	0.465
8	Sono presenti lesioni alla coda?	0	0	1.000
9	E' presente il comportamento di mordicchiamento delle orecchie?	62	75	0.590
10	E' presente il comportamento di mordicchiamento della coda?	0	0	1.000

Nella presente prova il global score non ha evidenziato una diminuzione dello stato di benessere dei soggetti in relazione alla riduzione dello spazio. Si osserva invece una riduzione della capacità antiradicalica totale di sangue ed emazie dopo lo stress indotto dalla riduzione dello spazio disponibile, indice di un minor benessere dei suini.

In conclusione, il test KRL è risultato in grado di evidenziare differenze nell'attività antiradicalica di sangue ed emazie in relazione allo stress indotto dalla riduzione dello spazio disponibile.

ZOOTECNIA DI PRECISIONE

Parametri di riferimento

La prima fase del lavoro si è incentrata sulla registrazione d'immagini e sulla elaborazione di dati di riferimento da utilizzare nella fase successiva.

La registrazione on-line delle immagini è avvenuta durante un intero ciclo di svezzamento e durante un intero ciclo di magronaggio - ingrasso presso un allevamento a ciclo chiuso sito in provincia di Milano. Sono stati raccolti ed "etichettati" 464.400 fotogrammi e su questi sono stati calcolati l'indice di attività ed occupazione.

Le registrazioni sono poi state controllate e sottoposte a *labelling*, ovvero sono state tutte esaminate ed è stata attribuita una diversa "etichetta" per ogni frame in funzione del tipo di comportamento mostrato dagli animali.

Come ci si attendeva si è evidenziato un aumento dell'indice di attività in corrispondenza della somministrazione dell'alimento che avveniva tre volte al giorno (alle ore 8:30, 15:30 e 21:30). Un altro picco dell'indice di attività è correlato alla presenza dell'uomo nella sala, o quando i suini percepiscono le vibrazioni dei tubi causate dal passaggio del cibo. I valori registrati durante la notte hanno mostrato valori più bassi.

Ricerca di una relazione tra l'indice di attività e di occupazione con il comportamento dei suini

Nella seconda fase del progetto è stato analizzato un nuovo database d'immagini sulle registrazioni del primo anno: queste sono state etichettate per verificare se comportamenti ripetibili corrispondano a variabili matematiche anch'esse ripetibili.

L'analisi effettuata nel secondo anno ha previsto "l'etichettatura" di 320.608 fotogrammi.

Si è proceduto con un'analisi descrittiva dei diversi comportamenti riscontrati tra gli animali allevati durante il periodo di campionamento (Tabella 6).

Tabella 6. Medie e deviazioni standard degli indici di attività e di occupazione dei comportamenti osservati in ciascuna zona.

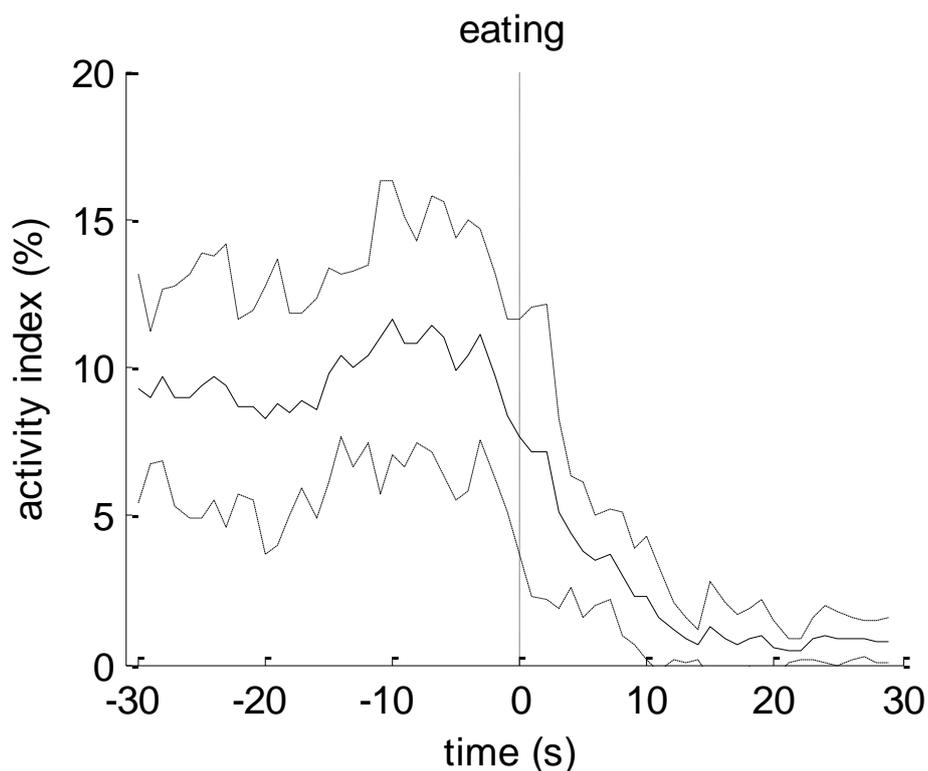
Zona del box	N. osservazioni	Tipo di comportamento	Indice Occupazione	DEV STD	Indice Attività	DEV STD	P
1	253.714	Assenza di attività "0"	0.00402	0.00852	0.62814	0.07082	<.0001
2			0.00485	0.00890	0.30406	0.08032	<.0001
3			0.00431	0.00873	0.27054	0.06471	<.0001
4			0.00435	0.00894	0.66786	0.11238	<.0001
Totale:							
1	485	Fenomeni aggressivi "1"	0.01479	0.01342	0.57550	0.10572	<.0001
2			0.01476	0.01339	0.19939	0.09740	<.0001
3			0.02144	0.01512	0.23478	0.04633	<.0001
4			0.02221	0.01465	0.56833	0.10121	<.0001
Totale:							
1	1.996	Mordicchiamento "2"	0.01011	0.01095	0.58550	0.07947	<.0001
2			0.01115	0.01151	0.26365	0.10305	<.0001
3			0.01805	0.01654	0.21592	0.04662	<.0001
4			0.01164	0.01421	0.56022	0.14700	<.0001
Totale:							
1	60.295	Interazione "3" (annusamento/ mordicchiamento)	0.01147	0.01374	0.58544	0.10267	<.0001
2			0.01206	0.01355	0.28025	0.09250	<.0001
3			0.01428	0.01469	0.25181	0.07752	<.0001
4			0.01274	0.01466	0.62461	0.13462	<.0001
Totale:							
1	4.118	Assunzione alimento "4"	0.03941	0.04562	0.47966	0.11412	<.0001
2			0.02776	0.02981	0.19450	0.05184	<.0001
3			0.02394	0.02620	0.20263	0.04131	<.0001
4			0.04144	0.04535	0.49075	0.10765	<.0001
Totale:							

Dall'analisi si è ricavato che i vari comportamenti (fenomeni di aggressività e di mordicchiamento, interazione tra suini e assunzione di cibo) si sono verificati in corrispondenza di range definiti degli indici di attività e di occupazione variabili in funzione delle sotto aree o zone, come denominate in seguito, evidenziate dal software (Tabella 6).

Implementazione algoritmo

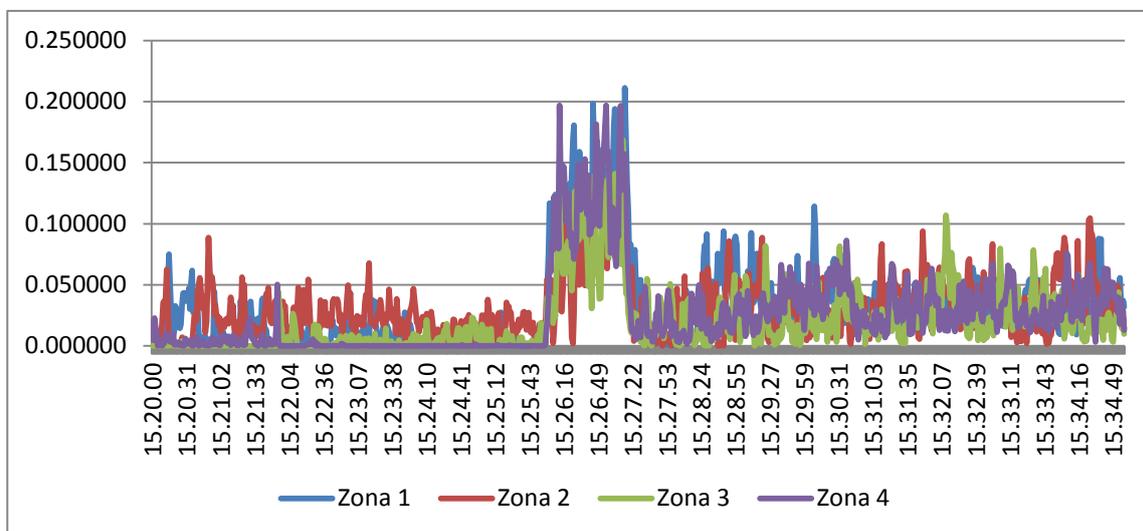
L'implementazione dell'algoritmo ha riguardato il comportamento classificato con "4" (assunzione di alimento). L'obiettivo è stato quello di sviluppare un sistema in grado di verificare che tutti gli animali raggiungano contemporaneamente il truogolo. Questo sistema ci permette di identificare precocemente situazioni di malessere tra gli animali allevati. La variazione di questi due indici ci permette di riconoscere l'esatto momento nel quale i suini si muovono tutti assieme per raggiungere il truogolo. Analizzando questo dato in modo più approfondito si è osservato che, nel momento in cui i suini si dirigono alla mangiatoia, l'indice di attività subisce un incremento, che decresce quando tutti gli animali si allineano al truogolo (Figura 27).

Figura 27. Variazione dell'indice di attività al verificarsi dell'assunzione di alimento. Il tempo 0 coincide con l'allineamento al truogolo dei suini.



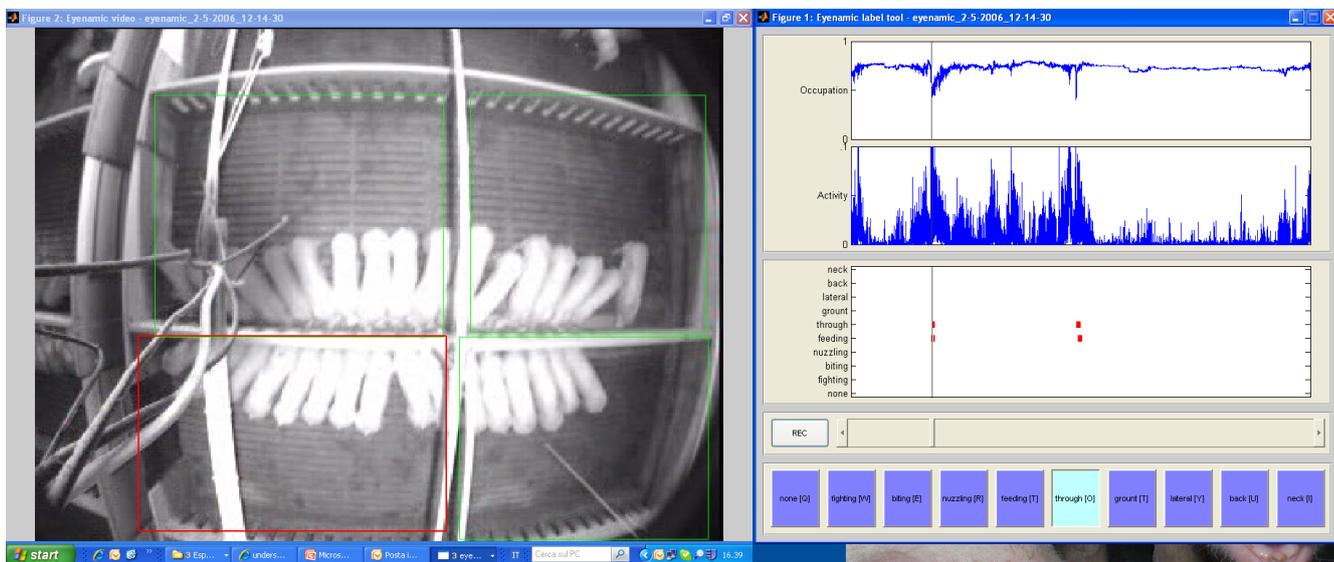
L'incremento dell'attività degli animali, durante la distribuzione del cibo, è facilmente riconoscibile anche nel grafico seguente (Figura 28), dove si può osservare con facilità come questo indice varia allo stesso tempo e modo in tutte le zone all'interno del box.

Figura 28. Variazione dell'indice di attività nelle quattro zone per il comportamento classificato come assunzione di alimento.



In Figura 29 si riporta l'applicazione dell'implementazione dell'algoritmo realizzato nella prima fase del progetto di ricerca, che ha permesso di classificare in maniera automatica il comportamento relativo all'assunzione di alimento.

Figura 29. Labelling tool. Identificazione automatica del comportamento di assunzione alimento



Questo sistema è in grado di fornire alcune indicazioni importanti sullo stato comportamentale-sanitario degli animali, infatti un ritardo all'allineamento al truogolo durante la distribuzione può

significare malessere. Una segnalazione precoce di questo comportamento può permettere un tempestivo e risolutivo intervento del veterinario aziendale.

Sensibilità a condizioni stressanti: rimescolamento dei soggetti

Nell'ultima fase del progetto si è deciso di affiancare le diverse metodologie. Anche la Zootecnia di Precisione è stata quindi utilizzata nella prova del rimescolamento dei soggetti per testarne la sensibilità.

Relazione tra l'indice di attività e di occupazione con il comportamento dei suini

E' stato analizzato il database creato dall'analisi delle immagini realizzate sulle registrazioni effettuate durante la prova del rimescolamento dei soggetti.

L'attività animale e i comportamenti mostrati dai suini sono stati registrati seguendo la metodologia utilizzata durante i primi due anni di sperimentazione. L'analisi effettuata ha previsto "l'etichettatura" di 50.420 fotogrammi.

Dopo aver svolto il labelling delle immagini registrate e rilevato gli indici di occupazione e di attività, i dati ottenuti sono stati analizzati con il programma statistico (SAS Inst. Cary USA) così da evidenziare una relazione tra l'attività animale, l'indice di occupazione e i comportamenti mostrati dagli animali. Si è poi proceduto con un'analisi descrittiva dei diversi comportamenti riscontrati durante il periodo di campionamento.

Tramite l'analisi della varianza (Proc. GLM) sono stati analizzati gli indici di attività e di occupazione ed i parametri ambientali per poter determinare la significatività statistica e rilevare le possibili interazione tra questi. La variazione degli indici di attività e di occupazione è stata messa in relazione al rimescolamento degli animali e al trattamento alimentare dei due box: controllo ed integrato con antiossidanti naturali (PPG).

Sono poi stati analizzati i diversi comportamenti mostrati dagli animali al T0 (prima del rimescolamento) e al T1 (dopo il rimescolamento), in relazione al rimescolamento degli animali e al trattamento alimentare dei due box (C vs PPG).

Infine, con una procedura di correlazione è stata verificata l'associazione dei parametri esaminati nella ricerca.

In tabella 7 è riportata la frequenza % di diversi comportamenti osservati in relazione al rimescolamento ed al trattamento alimentare.

Tabella 7. Effetto del rimescolamento e del trattamento sulla frequenza di comportamenti osservati.

Comportamento	Box controllo		Box trattato PPG		P		
	Frequenza (%)		Frequenza (%)		Incidenza trattamento	Incidenza rimescolamento	
	T0	T1	T0	T1		C	PPG
Annusamento	3.45	5.83	7.65	18.13	<0.001	<0.001	<0.001
Succhiamento	17.85	20.62	34.88	23.42	<0.001	<0.001	<0.001
Belly Nosing	10.03	2.96	12.44	0.79	<0.001	<0.001	<0.001
Aggressione	0.40	0.07	0.05	0.21	<0.05	<0.001	<0.05
Mordicchiamento orecchie	0.17	0.48	0.87	2.93	<0.001	<0.001	<0.001
Mordicchiamento coda	0	0.04	0	0.80	<0.001	<0.05	<0.001
Mordicchiamento fianco	0	0	0	0.88	<0.001	-	<0.001
Mordicchiamento zampe	0	0.43	0.72	0.52	<0.001	<0.001	<0.05
Alimentazione	37.71	32.17	40.69	30.81	<0.05	<0.001	<0.001

In tabella 8 è riportata la durata media di diversi comportamenti osservati in relazione al rimescolamento ed al trattamento alimentare.

Tabella 8. Effetto del rimescolamento e del trattamento sulla durata media dei comportamenti osservati.

Comportamento	Box controllo		Box trattato PPG	
	Durata media		Durata media	
	sec		sec	
	T0	T1	T0	T1
Annusamento	38	36	31	44
Succhiamento	352	703	193	173
Belly Nosing	69	202	60	22
Aggressione	19	9	7	28
Mordicchiamento orecchie	12	7	7	20
Mordicchiamento coda	0	5	0	109
Mordicchiamento fianco	0	0	0	40
Mordicchiamento zampe	0	15	26	36
Alimentazione	38	36	31	44

L'effetto del rimescolamento ha mostrato delle differenze in relazione al trattamento alimentare. Nel box alimentato nella dieta controllo si osserva un aumento della frequenza dell'annusamento, del succhiamento e del mordicchiamento alle orecchie dopo il rimescolamento degli animali. Si è osservato invece una riduzione del bellynosing e delle aggressioni in relazione al rimescolamento. Il gruppo dei trattati con PPG ha mostrato un numero superiore di episodi di annusamento, succhiamento, mordicchiamento alle orecchie. Si sono inoltre verificati più episodi relativi all'assunzione di alimento.

Nel box con suinetti alimentati con dieta integrata con antiossidanti naturali (PPG) si è avuto un aumento della frequenza e della durata dell'annusamento, del mordicchiamento e delle aggressioni. Si è osservata una riduzione del bellynosing e del succhiamento in relazione al rimescolamento. L'alimentazione arricchita con antiossidanti naturali ha indotto una diminuzione della durata degli episodi di succhiamento e bellynosing.

In tabella 9 si riporta l'effetto del rimescolamento e del trattamento alimentare sulla variazione degli indici di attività e di occupazione degli animali.

Nel box degli animali alimentati con PPG si è potuto riscontrare, sia prima che dopo il rimescolamento, un maggiore indice di attività e di occupazione rispetto al box controllo. Si identifica così un maggior benessere dei soggetti da imputarsi ad un maggior movimento correlato ad un'omogenea distribuzione all'interno del box.

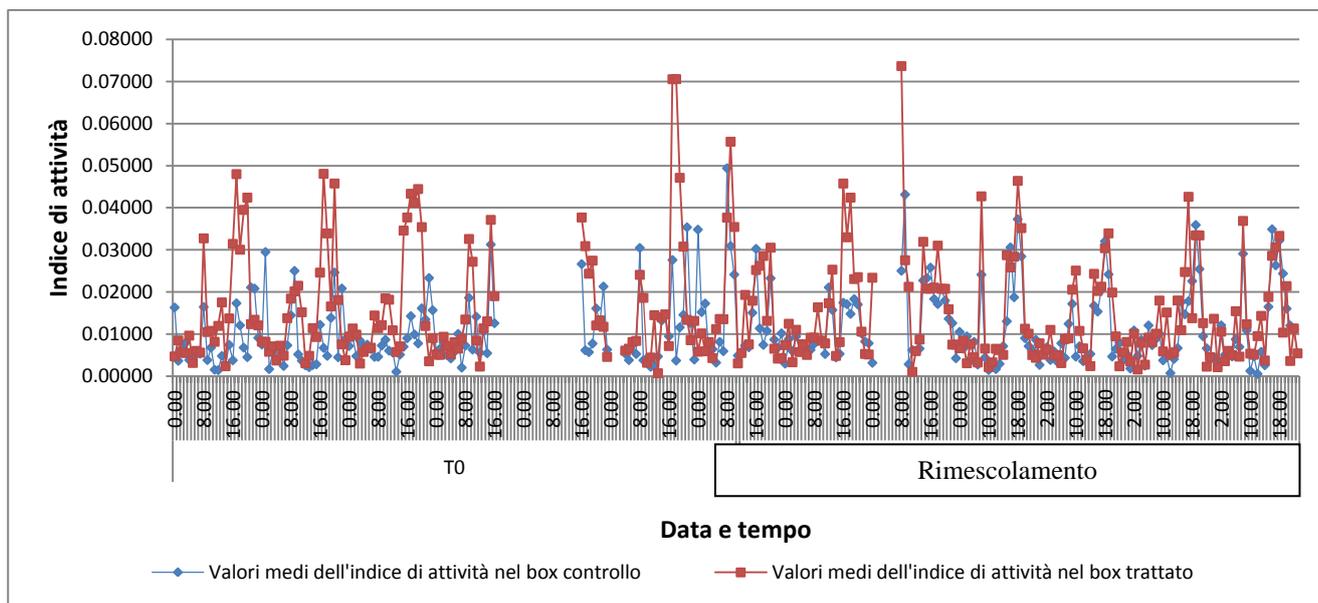
Tabella 9. Effetto del rimescolamento e del trattamento alimentare sulla variazione degli indici di attività e di occupazione degli animali

Indici	Controllo	PPG	P		
			Trattamento	Rimescolamento	
				C	PPG
Attività al T0	0.01018 ± 0.00843	0.01654 ± 0.01433	<0.001	NS	NS
Attività al T1	0.01127 ± 0.00875	0.01441 ± 0.01193			
Occupazione al T0	0.14403 ± 0.07997	0.25230 ± 0.10198	<0.001	<0.05	<0.05
Occupazione al T1	0.18509 ± 0.10942	0.28120 ± 0.12798			

Media ± SD

In figura 30 si rappresenta l'andamento giornaliero dell'indice di attività nei due box considerati. Si nota come l'andamento resti costante dopo il rimescolamento con picchi costanti.

Figura 30. Andamento dell'indice di attività prima e dopo il rimescolamento degli animali

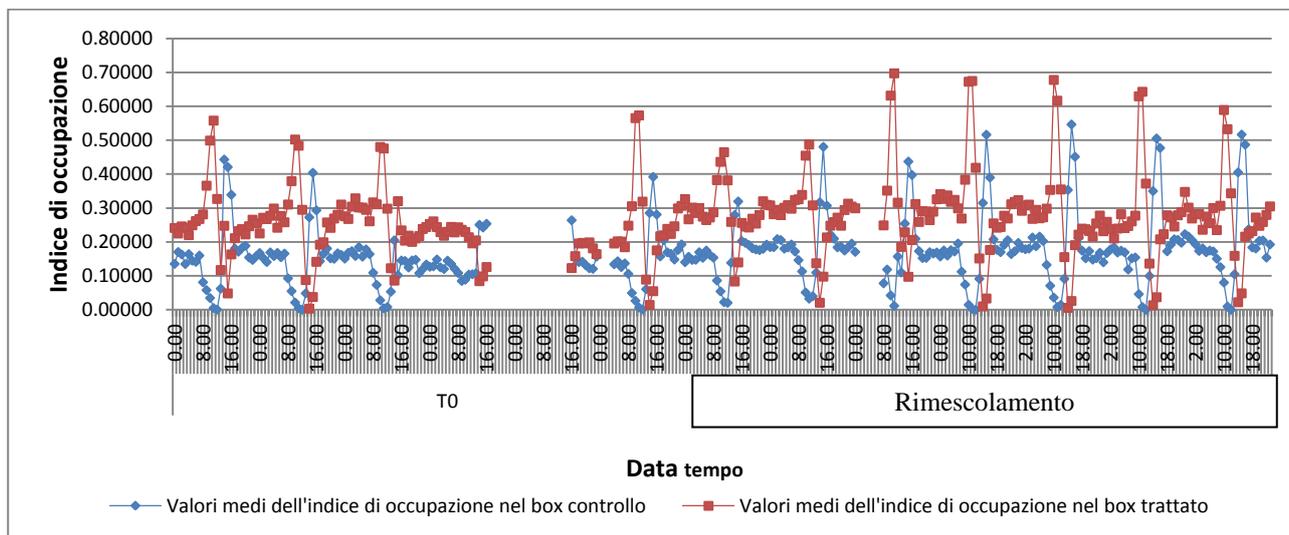


t0: periodo prima del rimescolamento

t1: periodo dopo il rimescolamento

=: rimescolamento degli animali

Figura 31. Andamento dell'indice di occupazione prima e dopo il rimescolamento degli animali



t0: periodo prima del rimescolamento

t1: periodo dopo il rimescolamento

=: rimescolamento degli animali

Nella figura 31 si evince come l'indice di occupazione del gruppo trattato sia costantemente più alto nel tempo: la maggiore uniformità di distribuzione degli animali sulla superficie deriva probabilmente dalla maggiore quantità di alimento assunto dal gruppo trattato.

Effetto della temperatura, dell'umidità e della ventilazione sull'attività degli animali

Nella sala dell'allevamento dove sono stati monitorati gli animali la ventilazione media era pari a 859 m³/ora, la temperatura media interna è stata di 28 ± 2,6 °C, l'umidità relativa media di 67 ± 8 %.

Lo studio dei parametri ambientali analizzati ha fornito spunti interessanti, evidenziando delle differenze significative sia nel box controllo che nel box trattato. In particolare è risultato che l'indice di attività degli animali è correlato significativamente con la temperatura interna (P < 0,001), la portata di ventilazione (P < 0,001), l'umidità relativa (P < 0,001) e con l'interazione di queste variabili.

Si è infatti visto come all'aumentare della temperatura, dell'umidità e di conseguenza all'aumentare della ventilazione l'attività animale viene notevolmente ridotta.

Si è inoltre trovata una correlazione significativa tra l'indice di occupazione degli animali, la ventilazione (P < 0,001), l'umidità (P < 0,001) e la temperatura (P < 0,001).

L'indice di occupazione degli animali è fortemente condizionato dai fattori ambientali, infatti a temperature e ventilazioni ottimali gli animali occupano omogeneamente la superficie del box, assumendo valori più vicino all'1 (posizionati su tutto il pavimento o ben sparsi).

Tabella 10. Effetto dei parametri ambientali sull'attività e sull'occupazione degli animali.

Variabili	Valori medi	P
Ventilazione	859 m ³ /ora	<0.001
Temperatura	28 ± 2.6 °C	<0.001
Umidità Relativa	67 ± 8 %	<0.001
Interazione	P	
Temperatura * Umidità Relativa	<0.001	
Temperatura * Ventilazione	<0.001	
Umidità Relativa * Ventilazione	<0.001	

Sensibilità a condizioni stressanti: riduzione dello spazio disponibile

Nell'ultima fase del progetto si è deciso di affiancare le diverse metodologie. Anche la Zootecnia di Precisione è stata quindi utilizzata nella prova della riduzione dello spazio disponibile.

E' stato analizzato il database creato dall'analisi delle immagini realizzate sulle registrazioni effettuate durante il terzo trattamento (Riduzione dello spazio disponibile).

L'attività animale e i comportamenti mostrati dai suini sono stati registrati seguendo la metodologia utilizzata durante i primi due anni di sperimentazione.

Dopo aver svolto il labelling delle immagini registrate e rilevato gli indici di occupazione e di attività, i dati ottenuti sono stati analizzati con il programma statistico SAS (SAS 9.2, SAS Inst. Cary USA) così da studiare una relazione tra l'attività animale, l'indice di occupazione e i comportamenti mostrati dagli animali. Si è poi proceduto con un'analisi descrittiva dei diversi comportamenti riscontrati durante il periodo di campionamento. I file degli indici di attività e di occupazione sono stati uniti ai parametri ambientali e quindi analizzati per rilevare le possibili interazioni tra questi, tramite analisi della varianza (Proc. GLM). La variazione degli indici di attività e di occupazione è stata messa in relazione alla riduzione dello spazio disponibile e al trattamento alimentare dei due box (controllo ed integrato con antiossidanti naturali PPG). Sono poi stati analizzati i diversi comportamenti mostrati dagli animali al T0 (prima del rimescolamento) e al T1 (dopo il rimescolamento), studiandone la variazione in base al trattamento alimentare dei due box (C *vs* PPG). Infine con una procedura di correlazione è stata verificata l'associazione dei parametri esaminati nella ricerca.

Effetto della riduzione dello spazio e del trattamento alimentare sulla frequenza dei comportamenti

Tabella 11. Effetto della riduzione dello spazio sulla frequenza (%) dei comportamenti

Comportamento	Box controllo con riduzione dello spazio Frequenza (%)		Box trattato (PPG) con riduzione dello spazio Frequenza (%)		P Incidenza della riduzione	
	Prima della riduzione	Dopo la riduzione	Prima della riduzione	Dopo la riduzione	Box controllo	Box trattato
Annusamento	1.65	1.22	4.20	6.09	NS	< 0.001
Succhiamento	0	5.33	0	1.23	< 0.001	< 0.001
Belly Nosing	0	4.32	0	0	< 0.001	-
Aggressione	1.14	0	0.84	0	< 0.001	< 0.001
Mordicchiamento alle orecchie	0.18	0.37	6.98	0.32	NS	< 0.001
Mordicchiamento alla coda	0.82	0.11	0.15	0	NS	< 0.05
Mordicchiamento al fianco	0	0	0	0	-	-
Mordicchiamento alle zampe	0.47	0	0.13	1.15	< 0.001	< 0.001
Alimentazione	83.55	30.13	69.17	13.31	< 0.001	< 0.001

Tabella 12. Effetto del trattamento alimentare sulla frequenza (%) dei comportamenti

Comportamento	Box controllo Frequenza (%)	Box trattato (PPG) Frequenza (%)	P Incidenza del Box (controllo e trattato)
Annusamento	3.52	0.42	< 0.001
Succhiamento	0	1.15	< 0.001
Belly Nosing	0	1.63	< 0.001
Aggressione	0	0.35	NS
Mordicchiamento alle orecchie	1.70	2.36	< 0.001
Mordicchiamento alla coda	0.38	1.84	NS
Mordicchiamento al fianco	0	0	-
Mordicchiamento alle zampe	00	1.61	< 0.001
Alimentazione	78.18	62.49	< 0.001

Tabella 13. Durata media in secondi dei diversi comportamenti in funzione della riduzione dello spazio e del trattamento alimentare

Comportamento	Box controllo con riduzione dello spazio		Box trattato (PPG) con riduzione dello spazio	
	Durata media di ogni singolo comportamento espressa in secondi		Durata media di ogni singolo comportamento espressa in secondi	
	Prima della riduzione	Dopo la riduzione	Prima della riduzione	Dopo la riduzione
Annusamento	18	26	19	19
Succhiamento	-	111	-	28
Belly Nosing	-	32	-	-
Aggressione	51	-	19	-
Mordicchiamento alle orecchie	8	6	14	5
Mordicchiamento alla coda	37	7	7	-
Mordicchiamento al fianco	-	-	-	-
Mordicchiamento alle zampe	21	-	6	26

Tabella 14. Durata media in secondi dei diversi comportamenti in funzione del trattamento alimentare, senza riduzione dello spazio

Comportamento	Box controllo senza riduzione dello spazio	Box trattato (PPG) senza riduzione dello spazio
	Durata media di ogni singolo comportamento espressa in secondi	Durata media di ogni singolo comportamento espressa in secondi
Annusamento	28	53
Succhiamento	-	128
Belly Nosing	-	41
Aggressione	-	17
Mordicchiamento alle orecchie	36	16
Mordicchiamento alla coda	24	18
Mordicchiamento al fianco	-	-
Mordicchiamento alle zampe	-	33

Effetto della riduzione dello spazio e del trattamento alimentare sulla frequenza dei comportamenti degli animali (Tabella 11 e 13):

Box trattato (PPG):

- Annusamento: dopo la riduzione dello spazio disponibile, si è avuto un incremento della frequenza di tale comportamento, mentre la durata di ogni singolo comportamento si è mantenuta uguale.
- Comportamento di succhiamento: si è potuto osservare solo dopo la riduzione dello spazio.
- Belly Nosing: nel box trattato non si è registrato tale comportamento, né prima della riduzione né dopo.
- Aggressioni: dopo la riduzione dello spazio non si è più osservato tale comportamento.
- Mordicchiamento alle orecchie (in maggior misura) e alla coda sono diminuiti dopo la riduzione dello spazio. E' invece aumentato di frequenza il mordicchiamento alle zampe.
- Alimentazione: dopo la riduzione dello spazio è diminuita la frequenza con cui i suinetti andavano ad alimentarsi.

Box controllo:

- Comportamento di succhiamento: si è potuto osservare solo dopo la riduzione dello spazio.
- Belly Nosing: anche questo comportamento è stato registrato solo in conseguenza della riduzione dello spazio.
- Aggressioni: come per il box trattato, dopo la riduzione dello spazio non si è più osservato tale comportamento.
- Mordicchiamento alle zampe: la sua frequenza è diminuita dopo la riduzione dello spazio.
- Alimentazione: come osservato nel box trattato, con la riduzione dello spazio è diminuita la frequenza con cui i suinetti andavano ad alimentarsi.

Effetto del trattamento alimentare sulla frequenza dei comportamenti degli animali (Tabella 12 e 14):

- Comportamento di succhiamento e annusamento: nel box non trattato (controllo) si è potuta osservare una maggior frequenza di tale comportamento con una minor durata.
- Succhiamento, Belly Nosing, Aggressioni: questi comportamenti si sono osservati solo nel box con trattamento alimentare.

- Mordicchiamento alle orecchie: si è registrato un maggior numero di tale comportamento nel gruppo dei suinetti trattati. La sua durata però è risultata essere maggiore nel box dei suinetti non trattati.
- Alimentazione: nel box controllo la sua frequenza è superiore rispetto a quella registrata nel box trattato.

Effetto della riduzione dello spazio e del trattamento alimentare sulla variazione degli indici di attività e di occupazione degli animali

Tabella 15. Valori medi degli indici di attività e di occupazione degli animali nei box sottoposti a trattamento alimentare e a riduzione dello spazio

Indici	Box Controllo con riduzione dello spazio	Box Trattato (PPG) con riduzione dello spazio	P	
	Media \pm dev std	Media \pm dev std	Incidenza riduzione spazio e trattamento alimentare	
Attività prima della riduzione	0.03124 \pm 0.03159	0.02617 \pm 0.03248	< 0.001	< 0.001
Attività dopo la riduzione	0.03033 \pm 0.02897	0.02720 \pm 0.05524		
Occupazione prima della riduzione	0.35309 \pm 0.04575	0.31969 \pm 0.07403	< 0.001	< 0.001
Occupazione dopo la riduzione	0.43565 \pm 0.20487	0.31389 \pm 0.17763		

Tabella 16. Valori medi degli indici di attività e di occupazione degli animali nei box sottoposti solo a trattamento alimentare

Indici	Box Controllo senza riduzione dello spazio	Box Trattato (PPG) senza riduzione dello spazio
	Media \pm dev std	Media \pm dev std
Attività	0.0171167 \pm 0.0231122	0.0266803 \pm 0.0466810
Occupazione	0.3268176 \pm 0.0604604	0.2973009 \pm 0.1115086

Analizzando più approfonditamente questi due indici (attività ed occupazione) si è visto come la riduzione della superficie del box, porti ad un aumento dell'indice di attività degli animali. Infatti come riportato in tabella 15, successivamente alla riduzione dello spazio disponibile si ha un aumento dell'attività animale, sia nel box sottoposto a trattamento alimentare che in quello controllo. Mettendo a confronto l'incremento dell'attività degli animali nel box trattato e nel box controllo si può vedere come questo sia maggiore nel box con trattamento alimentare e senza riduzione dello spazio. Sia la riduzione dello spazio che il trattamento alimentare agiscono sull'indice di occupazione determinando un decremento di questo. Infatti come si può vedere sia dalla tabella 15 che dalla tabella 16 l'indice di occupazione è superiore nel box controllo. Considerando invece la riduzione della superficie del box (tab. 15), questa determina una riduzione dell'indice di occupazione in quanto gli animali sono impossibilitati a distribuirsi omogeneamente all'interno del box.

Nei due grafici (32 e 33) è mostrato l'andamento giornaliero dell'attività e dell'occupazione degli animali sottoposti a trattamento alimentare con e senza riduzione della superficie disponibile.

A conferma di quanto è stato detto in precedenza, si può vedere graficamente come l'indice di attività registrato nei due box sottoposti a trattamento alimentare (con e senza riduzione dello spazio) sia pressoché uguale.

Quindi si ha un maggior incremento dell'attività animale in presenza di animali trattati ed un minore incremento a seguito di un fattore stressante come può essere la riduzione dello spazio disponibile

Grafico 32. Andamento dell'indice di attività nei box sottoposti a trattamento alimentare con e senza riduzione dello spazio disponibile (la freccia indica il momento della riduzione)

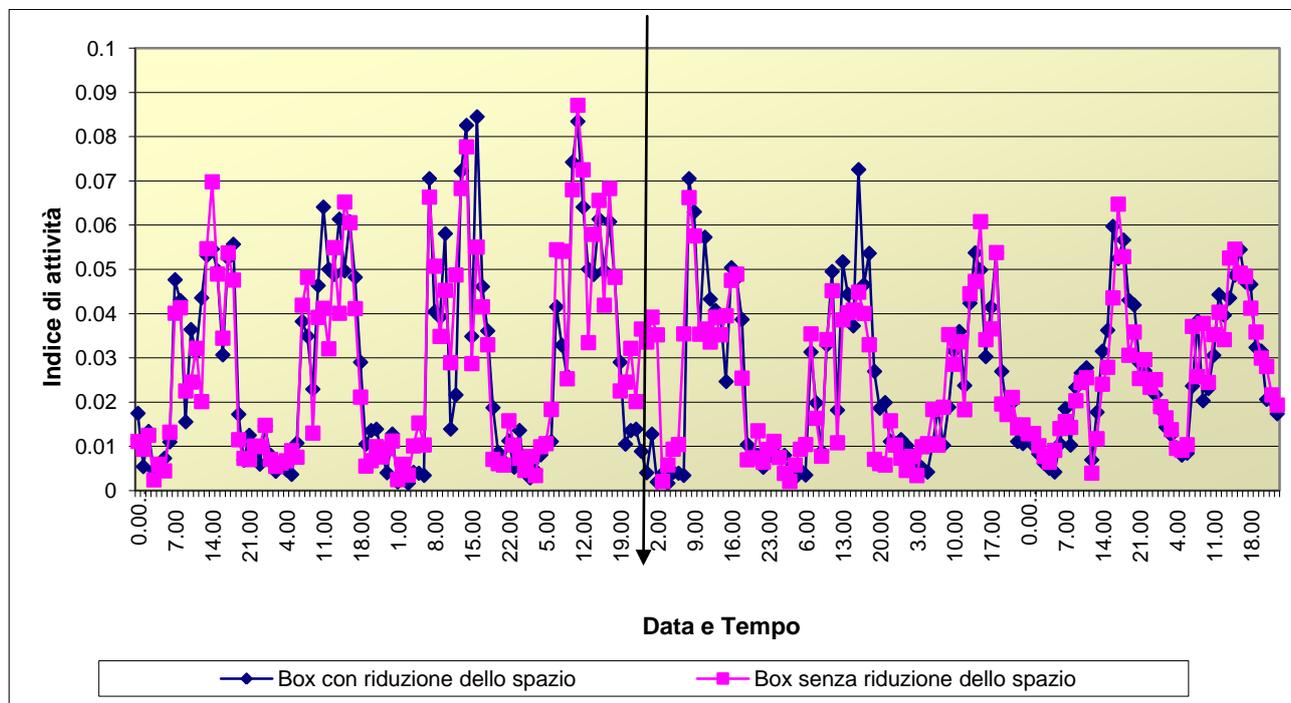
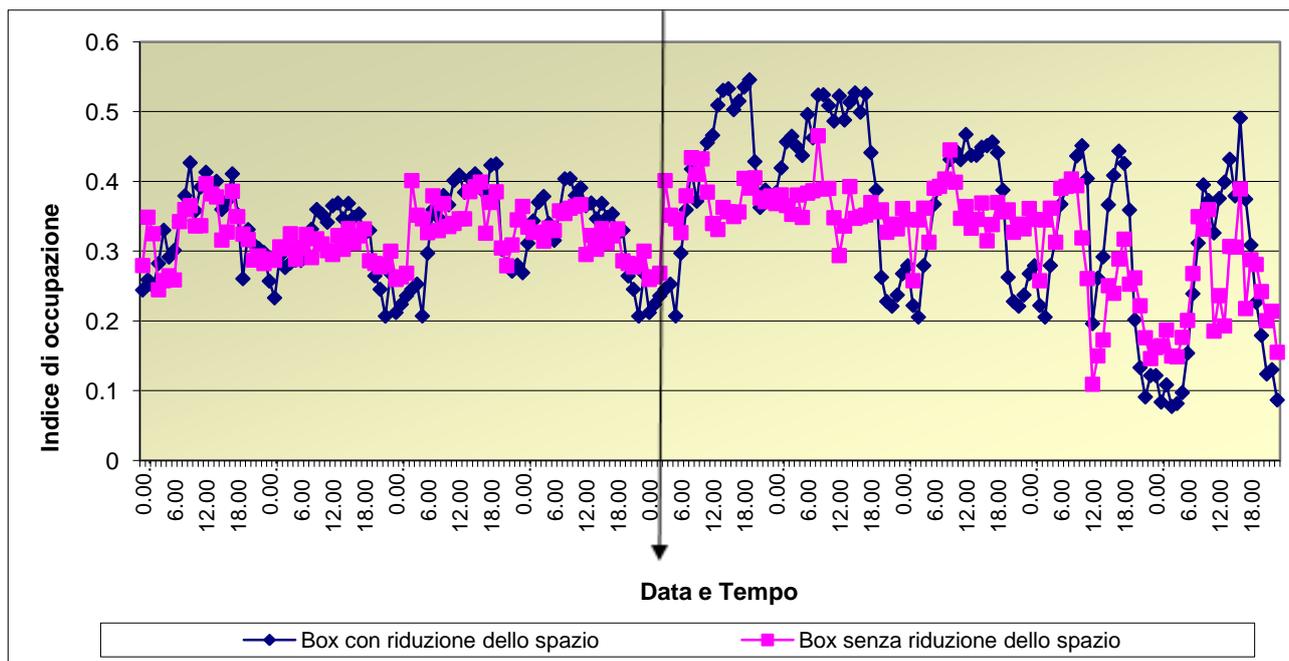


Grafico 33. Andamento dell'indice di occupazione nei box sottoposti a trattamento alimentare con e senza riduzione dello spazio disponibile (la freccia indica il momento della riduzione)



Effetto della temperatura, dell'umidità e della ventilazione sull'attività degli animali

Nella sala dell'allevamento dove sono stati monitorati gli animali la temperatura interna media è stata di $29 \pm 0,51$ °C, l'umidità relativa media di 52 ± 8 % e la ventilazione media pari a 4871 ± 1489 m³/h.

Dallo studio dei parametri ambientali è risultato che:

- l'indice di attività degli animali è correlato significativamente con la temperatura interna ($P < 0,05$), la ventilazione ($P < 0001$), l'umidità relativa ($P < 0,001$) (Tab. 34).

In accordo con le precedenti prove, si è potuto osservare che all'aumentare dei parametri ambientali (temperatura, umidità e ventilazione), l'attività animale viene notevolmente ridotta.

- l'indice di occupazione è correlato significativamente con i parametri ambientali monitorati temperatura interna ($P < 0,001$), ventilazione ($P < 0,001$) e umidità ($P < 0,001$).

L'indice di occupazione degli animali è fortemente condizionato dai fattori ambientali, infatti a temperature e ventilazioni ottimali gli animali occupano omogeneamente la superficie del box, assumendo valori più vicino all'1 (posizionati su tutto il pavimento o ben sparsi).

Tabella 34. Valori medi di temperatura, umidità e ventilazione

Variabili	Valori medi	P Attività	P Occupazione
Ventilazione	4871 ± 1.489 m ³ /ora	<0.001	<0.001
Temperatura	29 ± 0.51 °C	<0.05	<0.001
Umidità Relativa	52 ± 8 %	<0.001	<0.001

CONCLUSIONI E CONSIDERAZIONI SUI RISULTATI OTTENUTI

La misura dello stress ossidativo, mediante la valutazione dell'attività antiradicalica globale del sangue, si è dimostrata un parametro sensibile nell'identificare diverse condizioni di benessere determinate dal momento fisiologico dell'animale, dal tipo di struttura stabulativa, dalle integrazioni alimentari e dalla presenza di fattori stressanti. L'utilizzo di tale metodo analitico si configura quindi come un'innovazione nella valutazione oggettiva del benessere nella specie suina, in grado di fornire un dato globale dello stato fisiologico dell'animale.

Nella zootecnia lombarda, in cui l'allevamento suino ha vocazione altamente intensiva, l'applicazione in campo del test KRL permetterebbe di evidenziare eventuali squilibri metabolici consentendo un intervento tempestivo anche per evitare l'insorgenza di patologie conclamate e comunque potrebbe trovare valida applicazione nella stesura di protocolli di produzione certificata.

La zootecnia di precisione si è dimostrata un interessante strumento per l'osservazione del comportamento degli animali come metodo non invasivo e completamente automatico. Tale metodologia ha mostrato un'elevata sensibilità nel rilievo di variazioni anche minime del comportamento del suinetto in relazione a stress indotti da rimescolamento e riduzione dello spazio disponibile, fattori fortemente responsabili di decrementi produttivi in una delicata fase fisiologica quale il periodo post svezzamento. I risultati scaturiti dalla zootecnia di precisione possono quindi essere considerati come nuovi indicatori comportamentali del benessere nella specie suina, di pratico e facile utilizzo ed in grado di dare ai tecnici una valutazione immediata della realtà produttiva.

Entrambe le metodologie utilizzate ben si inseriscono nella logica del progetto europeo "Welfare Quality" da cui deriva il "Welfare Quality assessment protocol for pigs" presentato ad ottobre del 2009 in Svezia, che sposta l'attenzione sulle cosiddette "Animal-based Measures". Tale protocollo è ancora suscettibile, anche a parere degli stessi autori, di nuove modifiche che possano scaturire da evidenze scientifiche quali quelle riscontrate nel presente progetto.

I risultati ottenuti inoltre potrebbero valere ai fini di una certificazione per il benessere animale degli allevamenti italiani, mediante utilizzo di tecnologie oggettive e validate, con ricadute positive per la sicurezza alimentare e l'immagine del prodotto finale.

A livello europeo sono peraltro già presenti certificazioni del benessere da parte di enti quali "Product Authentication International (PAI)" e "Genesis Quality Assurance", mediante utilizzo di checklist che valutano l'adeguatezza delle strutture e del management aziendale.

Alla luce di queste considerazioni le due metodologie innovative utilizzate sembrano essere strumenti molto validi nella valutazione del benessere in maniera oggettiva, da qui l'esigenza di condurre ulteriori

ricerche per approfondire i diversi fattori di variazione anche per gli aspetti genetici, già oggetto di studio nell'ambito del progetto Pro.Zoo (realizzato dal Parco Tecnologico Padano di Lodi e dal Consorzio per la Ricerca e la Sperimentazione degli Allevatori, in collaborazione con Università, enti di ricerca e soggetti della filiera zootecnica) ed individuare protocolli di valutazione standardizzati in tutte le fasi dell'allevamento suino, in diverse tipologie di allevamento e con diverse modalità di alimentazione e razionamento, per permettere un'ottimizzazione dei costi di prelievo e/o rilievo ed un'elevata efficienza del risultato.

BIBLIOGRAFIA

- Aerts J.M., Van Buggenhout S., Lippens M., Buyse J., Decuypere E., Vranken E., Berckmans D. (2003). Active control of the growth trajectory of broiler chickens based on on-line animal responses. *Poultry Science*. 82(12): 1853-1862.
- Aguggini G., Beghelli V., Giulio L. (1998). *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia*. Torino, UTET, 874-882.
- Alipour M., Mohammadi M., Zarghami N., Nasser A. (2006). Influence of chronic exercise on red cell antioxidant defense, plasma malondialdehyde and total antioxidant capacity in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Sports Science and Medicine*. 5, 682-691.
- Appleby M.C., Hughes B.O. (1996). *Animal Welfare*. CAB International, Wallingford, U.K 19-31.
- Beilharz R.G., Cox D.F. (1967). Social dominance in swine. *Animal Behaviour* 15: 117-122.
- Benzie I.F.F., Szeto Y.T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/ antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (2): 633-636.
- Blaha T. (2005). Animal health, animal welfare, pre-harvest food safety and protecting the environment as key elements of animal production. *ISAH Vol 1: 17-21 - Warsaw, Poland*.
- Blache, D., Prost M., Raffi J. (1991). In vitro biological test of resistance to oxidation: Application to identification of irradiated food. In *Potential New Methods of Detection of Irradiated Food*. Commission of the European Communities, Luxembourg, pp. 105-116.
- Blache D, Prost M. (1992). Free radical attack: Biological test for human resistance capability. In *Proceedings of the IX College Park Colloquium on Chemical Evolution: A Lunar-Based Chemical Analysis Laboratory (LBCAL)*. C. Ponnampereuma and C. W. Gehrke, editors. NASA, Washington D.C., 82-98.
- Bloemen H., Berckmans D., Aerts J.-M., Goedseels V. (1997). Image analysis to measure activity of animals. *Equine Veterinary Journal, Suppl. 23: 16-19*.
- Bono G. (2000) Indicatori di malessere e di stress negli animali da reddito. Tavola rotonda SISVET pp. 1-18.
- Brambilla G., Civitareale C., Ballerini A., Fiori M., Amadori M., Archetti L.I, Regini M., Betti M. (1992). Response to oxidative stress as a welfare parameter in swine. *Redox Report*, 7:159-163.
- Candotti P., Rota Nodari S., Tranquillo M., Mattiello S., Verga M. A. (2007). New approach to welfare measurement in weaned piglets: the behavioural rating scale. *Atti Convegno Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (SIPAS)*. Vol. 33: 317-325.
- Cao G., Alessio H.M., Cutler R.G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 14: 303-311.
- Chung Y.K., Mahan D.C., Lepine A.J. (1992). Efficacy of dietary D-alpha-tocopherol and DL-alpha-tocopheryl acetate for weanling pigs. *Journal of Animal Science*, 70: 2485-2492.

- Corino C., Rossi R., Musella M., Cannata S., and Pastorelli G. (2007). Growth performance and oxidative status in piglets supplemented with verbascoside and teupolioside. *Italian Journal of Animal Science*. 6: 292-294.
- Curtis, S. E. (1996). Effects of environmental design on the pig's voluntary feed intake. *Proc. Pork Industry Conference*. University of Illinois, Urbana, pp. 60-73.
- D'Eath R.B. (2005) Socialising piglets before weaning improves social hierarchy formation when pigs are mixed post-weaning. *Applied Animal Behaviour Science* 93: 199–211.
- De Groot J., Ruis M.A.W., Scholten J.W., Koolhaas J.M., Boersma W.J.A. (2001) Long-term effects of social stress on antiviral immunity in pig. *Physiology & Behavior* 73: 145-158.
- Duncan I.J.H., Fraser D. (1997). Understanding animal welfare. In: Appleby MA, Hughes BO, eds. *Animal Welfare*. Wallingford, UK: CABI Publ. Pp.19–31.
- Duncan, I. J. H. (1981). Animal rights—Animal welfare: A scientist's assessment. *Poultry Science* 60:489–499.
- Duncan, I. J. H., Dawkins M. S. (1983). The problem of assessing “well-being” and “suffering” in farm animals. in: *Indicators Relevant to Farm Animal Welfare*. D. Smidt, ed. Martinus Nijhoff, The Hague, the Netherlands pp. 13–24.
- EFSA, 2005. Scientific report B. The welfare of weaners and rearing pigs: effects of different space allowances and floor types. In *Annex to the EFSA Journal* 268: 1–19.
- ERSAF, 2010. Ente Regionale per i Servizi all'agricoltura e alle Foreste. Il mercato dei Suini Produzioni e consumo.
- Ewbank R., Bryant M.J. (1972). Aggressive behaviour amongst groups of domesticated pigs kept at various stocking rates. *Animal Behaviour* 20: 21-28.
- EU legislative references: http://ec.europa.eu/food/animal/welfare/references_en.htm
- Farver, T. (1997). Concepts of normality in clinical biochemistry. In Kaneko J.J., J.W. Harvey and ML Bruss (eds), *Clinic Biochem Domestic Anim*, Academic Press San Diego pp 1-19.
- Favier A. (2003) Le stress oxidant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* - novembre-décembre, 108-115.
- Frost A. R., Parsons D. J., Stacey K. F., Robertson A. P., Welch S. K., Filmer D., Fothergill A. (2003) Progress towards the development of an integrated management system for broiler chicken production. *Computers and Electronics in Agriculture*, 39: 227-240.
- Gillman C.E, KilBride A.L., Ossent P., Green L.E. (2009). A cross-sectional study of the prevalence of foot lesions in post-weaning pigs and risks associated with floor type on commercial farms in England. In: *Preventive Veterinary Medicine* 91:146-152.
- Guarino M., Costa A., Van Hirtum A., Jans P., Ghesquiere K., Aerts J.M., Navarotto Pl., Berckmans D. (2004). Automatic detection of infective pig coughing from continuous recording in field situations. *Rivista di Ingegneria Agraria*, 4, 9-13.

- Guillou D., Launay C., Durand P., Prost M. (2009). Effet de la supplémentation en vitamine e et en sélénium organique sur la mesure du potentiel global de défense anti-radicalaire des porcelets. Journées Recherche Porcine. 41: 195-196.
- Halachmi I., Metz J.H.M., Van't Land A., Halachmi S., Kleijnen J.P.C. (2002). Case study: Optimal facility allocation in a robotic milking barn. Transactions of the ASAE, 45 (5): 1539-1546.
- Heetkamp M. J., Schrama J. W., De Jong L., Swinkels J. W., Schouten W. G. and Bosch M. W. (1995). Energy metabolism in young pigs as affected by mixing. Journal of Animal Science, 73: 3562-3569.
- Henry J.P., Stephens P.M. (1977). Stress, health and the social environment. A sociobiological approach to medicine". Springer-Verlag, New York.
- Hughes B.O., Duncan I.J.H. (1988). Behavioural needs: can they be explained in terms of motivational models? Applied Animal Behaviour Science 20: 352-355.
- Jensen P., Redbo I. (1987). Behaviour during nest leaving in free-ranging domestic pig. Applied Animal Behaviour Science 18: 355-362.
- ISTAT, 2009. Istituto Nazionale di Statistica.
- Lauritzen B., Lykkesfeldt J., Friis C. (2005). Evaluation of a single dose versus a divided dose regimen of amoxicillin in treatment of Actino-Bacillus pleuropneumoniae infection in pigs. Research in Veterinary Science; 79: 61–67.
- Lauridsen C., Jensen S.K. (2005). Influence of supplementation of all-rac- α -tocopheryl acetate preweaning and vitamin C postweaning on α -tocopherol and immune responses of piglets. Journal of Animal Science. 83: 1274-1286.
- Leroy T., Vranken E., Struelens E., Sonck B., Berckmans D. (2005) .Computer vision based recognition of behavior phenotypes of laying hens. ASAE Annual meeting, paper n°: 054002.
- Lesgards J.F., P. Durand M., Lassarre P., Stocker G., Lesgards A., Lanteaume M., Prost M., Lehucher-Michel M.P. (2002). Assessment of lifestyle effects on the overall antioxidant capacity of healthy subjects. Environmental Health Perspectives, 110: 479-487.
- Lykkesfeldt J., Svendsen O., (2007). Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. In: Veterinary Journal. 173: 502–511.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition. 79: 727-47.
- Merlot E. (2004) Conséquences du stress sur la fonction immunitaire chez les animaux d'élevage. INRA Productions Animales, 17 (4): 255-264.
- Miller N.J., Rice-Evans C, Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clinical Science. 84: 407-412.
- Monaghan, P., Neil, B.M., Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. Ecology Letters. 12: 75-92.

- Møller S., Lauridsen C. (2006). Dietary fatty acid composition rather than vitamin E supplementation influence ex vivo cytokine and eicosanoid response of porcine alveolar macrophages. *Cytokine* 35: 6–12.
- Morag I., Edan Y., Maltz E. (2001). An individual feed allocation decision support system for the dairy farm. *Journal of Agricultural Engineering Research*. 79 (2): 167-176.
- Nanni Costa L., Tassone F., Righetti R., Melotti L. Comellini M. (2007). Effect of farm floor type on the behaviour of heavy pigs during pre-slaughter handling. *Veterinary Research Communication*. 31(Suppl. 1): 397–399.
- Neill C.R., Nelssen J.L., Tokach M.D., Goodband R.D., DeRouchey J.M. Dritz S.S., Groesbeck C.N., Brown K.R. (2006). Effects of Oregano oil on performance of nursery pigs. *Journal of Swine Health and Production*. 14(6):312-316.
- Owusu-Asiedu A., Ekpe E.D., Zijlstra R.T., Patience J.F., Classen H.L., Simmins P.H. (2003). Effect of dietary fibre on feed intake and growth performance in weaned pigs. *Canadian Journal of Animal Science*. 83: 628- 638.
- Pastorelli G., Rossi R., Cannata S., Corino C., 2009. Total antiradical activity in male castrated piglets blood: reference values. *Italian Journal of Animal Science* 8 (Suppl.2): 640-642.
- Pedersen L.J. (1993). The influence of stress and the social environment on oestrus and mating in swine. Thesis Copenhagen.
- Pehrson B., Holmgren N., Trafikowska U. (2001). The Influence of Parenterally Administered α -Tocopheryl Acetate to Sows on the Vitamin E Status of the Sows and Suckling Piglets and Piglets After Weaning. *Journal of Veterinary Medicine A*. 48: 569-575.
- Pluske J.R., Fenton T.W., Lorschy M.L., Pettigrew J.E., Sower A.F., Aherne F.X. (1997). A modification to the isotope –dilution technique for estimating milk intake of pigs using pig serum. *Journal of Animal Sciences*. 75: 1279-1283.
- Prost, M., 1992. Process for the determination by means of free radicals of the antioxidant properties of a living organism or potentially aggressive agents. U.S. patent no. 5,135,850. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Rossi R., Costa A., Guarino M., Laicini F., Pastorelli G., Corino C. (2008). The effect of group size-floor space allowance and floor type on growth performance and carcass characteristics of heavy pigs . *Journal of Swine Health and Production*. 16(6): 304–311.
- Rossi R., Corino C., Pastorelli G., Pastorelli, Durand P., Prost M. (2009). Assessment of antioxidant activity of natural extracts. *Italian Journal of Animal Sciences*. 8 (supp 2): 655-657.
- Ruiterkamp W.A. (1987). A comparative study of the wellbeing of fattening pigs. In: *Tijdschr Diergeneeskd*. 111: 520–552.
- Salvi A., Brühlmann C., Migliavacca E., Carrupt P.A., Hostettmann K., Testa B. (2002). Protein protection by antioxidants: development of a polyphenols. *Helvetica Chimica Acta*. 85: 867-872.
- Sauerwein H., Schimtz S., Hiss S. (2005). Acute phase protein haptoglobin and its relation to oxidative stress in piglet undergoing weaning-induced stress. *Redox Report*. 10(6): 295-302.

- Sies H. (1997). Oxidative Stress: Oxidants And Antioxidants. *Experimental Physiology* 82: 291- 295.
- Stocker P., Lesgards J.F., Vidal N., Chalier F., Prost M. (2003). ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochemical and Biophysical Acta* 1621:1-8.
- Vincenzi E., Fantinati P., Cappi M. (2005). La biodisponibilità di vitamina E. *Rivista di Suinicoltura*. 6: 78-85
- Waiblinger S., Knierim U., Winklker C. (2001). The development of and epidemiologically studies based on-farm welfare assessment system for use with dairy cows. *Acta Agriculturae Scandinavica, A-AN* 30(Suppl.):73-77.
- Whitehead M.L., Lonsbury-Martin B.L., Martin G.K. (1992). Evidence for two discrete sources of $2f_1$ - f_2 distortion-product otoacoustic emissions in rabbit. Differential physiological vulnerability. *Journal of the Acoustical Society of America*. 92: 2662-2682.
- Wiesław K. (2010). Blood antioxidant defence in horses during physical exercises. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 54: 617-624.
- Wolter, B. F., Ellis M., Curtis S. E., Parr E. N., Webel D. M. (2000). Group size and floorspace allowance can affect weanling-pig performance. *Journal of Animal Science*. 78: 2062-2067.
- Yen J. T., Pond W. G. (1987). Effect of dietary supplementation with vitamin C or carbadox on weanling pigs subjected to crowding stress. *Journal of Animal Science*. 64: 1672-1681.



Regione Lombardia
Agricoltura

Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura

www.agricoltura.regione.lombardia.it