

CONSEGUENZE DELLA DENSITÀ POPOLAZIONALE SULLE VARIAZIONI LEUCOCITARIE IN CONIGLI.

Walter Motta Ferreira 1/

Egladson João Campos 1/

Laura de Sanctis Viana 2/

Sheila Regina Andrade Ferreira 1/

1/ Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - "Campus da Pampulha" - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil - CEP. 30.000 Caixa Postal 567.

2/ Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG - Av. Amazonas, 115 - Sala 615 - 6º andar. 30.000 - Belo Horizonte.

INTRODUZIONE

Situazioni ambientali scomode, tra le quali una densità popolazione elevata, possono provocare disturbi relazionati con il sistema nervoso e l' endocrino. La parola "stress" è ancora usata per definire queste alterazioni organiche osservate negli animali e nell' uomo descritte da FRASER et alii (1975), FRIEND (1980), JECHE (1980), SCOTT (1981) e YOUNG (1981). Dai primi studi fatti sulla ipotetica fisiologia dello "stress" CANNON (1929) e SELYE (1936), molte altre osservazioni descritte in varie specie animali dimostrando, che probabilmente l' azione fisiologica basica si da per stimoli persistenti che modificano il tipo neuro-umorale dell'asse ipofisi-surrenale. Ciò per la liberazione dell' ACTH, provocando un aumento dell' attività se cretrice dei corticosteroidi della cortex-surrenale come una maniera di ridurre o compensare i tassi del ormone ipofisario. L' ipertrofia della ghiandola surrenale e le variazioni anormali nel conteggio globale e differenziale dei leucociti circolanti, sono alcuni degli effetti derivanti in conseguenza della presenza dell' ACTH e di corticoidi nel sangue. La letteratura relativa sugli effetti dell' ACTH e dei corticoidi sui leucociti circolanti e abbastanza vasta sia per l' uomo che per gli animali. SILVA et alii (1980) descrivendo la prova di "THORN", vide che uno stimolo della cortex surrenale, attraverso una iniezione di ACTH. Nell' uomo, provoca una riduzione del numero di eosinofili nel sangue. Affermano pure che gli ormoni della cortex della surrenale possono causare una eosopenia, leucocitosi e linfocitosi in molte altre specie. Negli ovis, HOLM et alii (1951) ossevarono che dopo un iniezione di 200 mg di acetato di cortisone, si manifestava una accentuata riduzione di eosinofili e di linfociti come pure un aumento nel percentuale dei neutrofili. LUKE (1953) vide che un ora dopo l' iniezione di ACTH nell'estratto della cortex surrenale in suini apparivano accentuate linfopenie, neutrofilie e leucocitosi sperimentando su mucche normali HOPWOOD & TIBOLLA (1958) iniettarono 400 UI di ACTH e constatarono che gli eosinofili diminuivano da 66 a

93% sulla media osservata. WEGNER et alii (1974) studiarono su mucche da latte della razza HOLSTEIN, gli effetti della iniezione di corticotropina. Con confinamento in ambiente climatizzato e epoca dell'anno piú calda, come trattamenti di sconforto ambientale, dal conteggio globale dei leucociti e delle cellule somatiche del latte, osservarono che in tutte le condizioni scomode risultava una moderata leucocitose e un lieve aumento del conteggio delle cellule somatiche del latte, associate alle iniezioni di corticotropina all'epoca calda dell'anno. SALEH & JAKSCH (1977) studiando vari fattori, di "stress" in galline, videro che l'iniezione di ACTH aumentava significativamente le variazioni di leucociti totali e di glicemia. Sotto uno "stress" termico ci fu un aumento significativo dei corticoidi sanguigni e una diminuzione nel tasso di glicemia e nel numero di eosinofili e eterofili. Le galline sottoposte a una restrizione alimentare e di acqua, aumentarono significativamente la concentrazione di corticoidi nel sangue. L'esercizio forzato e l'inquietazione degli animali aumentava significativamente i corticoidi e la glicosi sanguinea. ROSSDALE et alii (1982) hanno osservato la relazione dei neutrofili x linfociti e i tassi di cortisol nel plasma di cavalli dopo l'iniezione di ACTH e di esercizi muscolari, concludendo che i tassi di cortisol furono significativamente aumentati dopo 60 minuti dalla applicazione dell'ormone e immediatamente dopo l'esercizio. La relazione neutrofili x linfociti ha subito cambiamenti significativi dopo 240 minuti dalla iniezione e 180 minuti dopo l'esercizio muscolare. Si è notata una lieve linfocitose dopo gli esercizi muscolari. JACOBSON et alii (1978) quando hanno paragonato dati ematologici di conigli selvaggi, americani, "Cottontail Rabbit" (*Sylvilagus floridanus*) tra i cacciati e i presi in trappole hanno verificato che gli animali intrappolati possiedono alti livelli significativi di corticoide e una percentuale pure significativa di segmentati (neutrofili) e piú basse percentuali significative di linfociti che quelli abbattuti durante la caccia. I conigli intrappolati presentavano pure maggiori quantità di nitrogene ureico nel sangue. In questo studio si è cercato di vedere se lo stato di "stress" fisiologico possa essere evidenziato dalla variazione leucocitaria al termine dell'allevamento dei conigli da carne, allevati in diverse densità popolazionali.

MATERIALI E METODI

Furono usati 54 femmine e 54 maschi della razza Nuova Zelanda Bianca, svezzati con 28 giorni e dopo un periodo pre-sperimentale di 7 giorni, con l'età di 35 giorni, ebbe inizio l'esperimento che durò 6 settimane. Gli animali furono messi in gabbie metalliche con mangiatoia di metallo e abbeveratoio automatico in un capannone di mattoni, semi aperto localizzato nella città di Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasile. La temperatura ambiente è stata di $28,68 \pm 2,64^{\circ}\text{C}$ per la massima e $21,45 \pm 1,81^{\circ}\text{C}$ per la minima. L'umidità relativa $66,82 \pm 9,78\%$ - Altitudine 950 S.L.M. Le densità popolazionali usate furono di 1200, 900, 720 e 600 cm^2 per coniglio dando così 3, 4, 5 e 6 animali per ogni gabbia e per ogni sesso. Il delineamento sperimentale utilizzato fu del tipo interamente casualizzato con lo schema fattoriale di 4 densità 2 sessi e 3 ripetizioni per ogni trattamento, dando un totale di 24 parcelle sperimentali.

Gli animali sono stati alimentati durante lo studio con mangime commerciale granulato "ad libitum" e un supplemento di fieno di "Pangola" (*Digitaria decumbens*, STENT) dalla 4ª settimana sperimentale nelle quantità di 50 g/giorno/animale. Alla fine della 6ª settimana gli animali furono sacrificati e raccolte mostre di sangue rappresentative dei trattamenti. Il sangue era raccolto in bottiglie con EDTA (acido etilenodiaminoacetico-sale sodico) a 10%, nella quantità di 0,1 ml per ogni 5 ml di sangue. Le norme del preparato della lamina e dei conteggi globali e differenziali di leucociti furono quelle usate da LIMA et alii (1969). Quando nei valori analizzati c'erano numeri percentuali questi furono normalizzati nell'angolo corrispondente in arcoseno d'accordo con la tabella descritta da FISHER & YATES (1971). I risultati furono analizzati usando la prova di "dms" di "Student" da SNEDECOR & COCHRAN (1967).

RISULTATI E DISCUSSIONI

a) Conteggio globale dei leucociti:

I risultati del conteggio globale dei leucociti appare nella TAB. I. Si è cercato di dimostrare in questo studio se il la variazione del conteggio globale dei leucociti era originato dagli effetti della densità popolazionale e dal sesso. La densità non fu statisticamente significativa ($P < 0,05$). Le differenze osservate tra i vari trattamenti fanno vedere una diminuzione nel numero dei leucociti quando la densità di 1200, passa a 720 cm^2 e aumenta un'altra volta quando passa a 600 cm^2 . La differenza tra la media maggiore (densità di 600 cm^2) e la minore (densità di 720 cm^2) è di 26%, anche se non significativa. E' difficile, qui, una posizione critica consistente quanto a questa irregolarità, a non essere che questo fatto possa essere osservato in un altro studio, nelle stesse condizioni, perché malgrado la insignificanza statistica dei risultati ottenuti lo studio offre questa possibilità. Questa discussione relazionata a un campione ridotto è un fattore di aumento della instabilità nella variabile come può essere comprovato dal coefficiente di variazione ottenuto di 42,13%. La media generale fu di 8217 + 3461 di leucociti per millimetro cubo di sangue. I maschi presentarono 7,8% in più leucociti circolanti per millimetro cubo di sangue che le femmine, ma, questa differenza non fu significativa ($P < 0,05$). L'interazione densità x sesso, pure non fu significativa ($P < 0,05$).

TABELLA I - Distribuzione media del numero di leucociti totali per millimetro cubo al termine della 6ª settimana sperimentale dipendendo dalla densità e dal sesso.

SESSO	DENSITÀ (cm^2 /coniglio)				\bar{X}_s
	1.200	900	720	600	
Maschi	9.517	6.683	5.417	12.583	8.550
Femmine	8.033	9.417	8.233	5.850	7.883
\bar{X}_D	8.775	8.050	6.825	9.217	

\bar{X}_s = medie dei sessi

\bar{X}_D = medie delle densità

b) Conteggio differenziale di leucociti

b.1. Eosinofili

La disattivazione dell' istamina o di sostanze somiglianti è la funzione più importante degli eosinofili. L' aumento del numero di eosinofili (eosinofilia) può succedere in reazioni allergiche, reazioni anafilattiche, parassitismo, insufficienza adrenocorticale etc. La diminuzione di questo numero (eosinopenia) fu indicata come un sintomo di "stress" in alcune specie secondo FERREIRA NETO et alii (1981). Così abbiamo cercato di verificare se tal fatto succedeva in conseguenza dei trattamenti. I percentuali medi calcolati hanno mostrato una distribuzione irregolare che sembra non accompagni l' effetto dei trattamenti. Le differenze trovate non sono significative statisticamente ($P < 0,05$). Il coefficiente di varianza (26,94%) si è presentato più stabile di quello trovato nei leucociti totali. L' ampiezza di normalità nel percentuale medio degli eosinofili d' accordo con KOTSCHKE GOTTSCHALK (1974) è circa il 3%. La densità di 600 cm^2 diede una media leggermente superiore. Nella TAB. II esponiamo i dati medi trovati per gli eosinofili.

TABELLA II - Distribuzione dei percentuali medi di eosinofili al termine della 6ª settimana sperimentale secondo la densità popolazionale ed il sesso.

SESSO	DENSITÀ POPOLAZIONALE (cm^2 /Coniglio)				
	1.200	900	720	600	\bar{X}_s
Maschi	2,33	3,00	1,33	2,67	2,33
Femmine	2,67	2,33	2,33	3,67	2,75
\bar{X}_D	2,50	2,67	1,83	3,17	

\bar{X}_s = medie dei sessi

\bar{X}_D = medie delle densità

b.2 - Linfociti

I risultati ricavati sulle percentuali medie di linfociti di maschi e femmine, sono rappresentati nella TAB. III. La funzione primaria dei linfociti è la produzione di anticorpi, potendo pure avere alcuna attività fagocitaria per particelle ultra microscopiche come in virus (FERREIRA NETO et alii 1981). La linfocitosi può apparire occasionalmente in animali, come nel caso di deficienza adrenocortical, ma, la linfocitopenia è importante in situazioni di "stress". I dati medi dei percentuali di linfociti hanno mostrato che gli effetti provocati dalla densità popolazionale ed il sesso, non furono significativi ($P < 0,05$). Il coefficiente di variazione fu, leggermente minore che per gli eosinofili (22,68%) e l' ampiezza di normalità media secondo KOTSCHKE & GOTTSCHALK (1974) sta tra 20 e 90% localizzandosi pertanto dentro i risultati ottenuti.

TABELLA III - Distribuzione di percentuali di linfociti, al termine della 6ª settimana sperimentale, secondo la densità popolazionale ed il sesso.

SESSO	DENSITÀ (Cm ² /Coniglio)				
	1.200	900	720	600	\bar{X}_s
Maschi	44,00	37,67	50,67	63,67	49,00
Femmine	48,67	46,67	57,33	37,33	47,50
\bar{X}_D	46,34	42,17	54,00	50,50	

\bar{X}_s = medie dei sessi

\bar{X}_D = medie delle densità

b.3 - Basofili

I basofili hanno funzioni poco conosciute. Alcuni autori citano la possibilità di produrre sostanze anticoagulanti per ridurre la coagulazione in zone di processo infiammatorio (FERREIRA NETO et alii 1981). Le differenze delle percentuali medie (TAB. IV) dei basofili analizzati, non furono statisticamente significative ($P < 0,05$) sotto l'aspetto di densità e sesso come pure l'interazione semplice di densità x sesso. I basofili si sono presentati più instabili che i linfociti e gli eosinofili, come si può constatare per il coefficiente di variazione di 52,67%. Le percentuali medie si inquadrano nei limiti di normalità citati da KOTSCHE & GOTTSCHALK (1974) che è tra 0,5 e 30%, anche se osservano pur se le medie furono più prossime al limite inferiore.

TABELLA IV - Distribuzione delle percentuali medie dei basofili al termine della 6ª settimana sperimentale secondo la densità e il sesso.

SESSO	DENSITÀ (cm ² /coniglio)				
	1.200	900	720	600	\bar{X}_s
Maschi	3,00	1,00	1,33	1,33	1,67
Femmine	2,00	1,00	1,33	1,67	1,50
\bar{X}_s	2,50	1,00	1,33	1,50	

\bar{X}_s = medie dei sessi

\bar{X}_D = medie delle densità

b.4. Neutrofili

Per il contagio differenziale dei neutrofili si sommarono le percentuali trovate di bastonetti segmentati, mielociti e metamilociti, le forme giovani dei neutrofili (mielociti e metamilociti) non apparirono nella lamina, indicando, probabilmente, che gli animali che fornirono i campioni di sangue non presentavano alterazioni patologiche o di convalescenza che sono al-

cune delle situazioni in cui occorre la neutrofilia e concomitantemente le forme giovani dei neutrofili. I numeri medi ottenuti (TAB. V) non presentarono differenze statisticamente significative ($P < 0,05$). Il coefficiente di variazione rimase prossimo a quello degli eosinofili e linfociti dimostrando la stessa instabilità tra gli altri tipi leucocitari. La densità di 900 cm^2 ha presentato una media lievemente superiore al limite di normalità citata da KOTSCHKE GOTSCHALK (1974) che è di 8 a 50%. In generale, tutte le medie ebbero valori vicini al limite superiore citato.

TABELLA V - Distribuzione delle percentuali medie dei neutrofili al termine della 6a. settimana sperimentale secondo la densità ed il sesso.

SESSO	DENSITÀ ($\text{cm}^2/\text{coniglio}$)				
	1.200	900	720	600	\bar{X}_s
Maschi	50,67	58,00	46,33	32,33	46,33
Femmine	45,33	49,67	38,00	57,00	47,50
\bar{X}_D	48,00	53,84	42,17	44,67	

\bar{X}_s = medie dei sessi

\bar{X}_D = medie delle densità

B_5 - Monociti

Le analisi dei risultati (TAB. VI) hanno dimostrato che le differenze, ottenute non furono statisticamente significative ($P < 0,05$). L'alto coefficiente di variazione (149,42%) è dovuto alla grande frequenza di campioni senza monociti. Le percentuali medie di tutte le densità e dei due sessi si collocarono sotto il limite minimo di monociti nel sangue di conigli, secondo KOTSCHKE & GOTTSCHALK (1974) che cita dall' al 4% come limite minimo.

TABELLA VI - Distribuzione dei percentuali medi di monociti al termine della 6a. settimana sperimentale secondo la densità e il sesso.

SESSO	DENSITÀ ($\text{cm}^2/\text{coniglio}$)				
	1.200	900	720	600	\bar{X}_s
Maschi	0,00	0,33	0,33	0,00	0,17
Femmine	0,67	0,33	1,00	0,33	0,58
\bar{X}_s	0,34	0,33	0,67	0,17	

\bar{X}_s = medie dei sessi

\bar{X}_D = medie delle densità

CONCLUSIONI

Le analisi e le discussioni dei risultati ottenuti come conseguenza delle condizioni stabilite in questa ricerca permettono concludere che: le osservazioni nelle variazioni del conteggio globale e differenziale di leucociti circolanti non sono stati utili come indicatrici di "stress" fisiologico eventualmente conseguente alle condizioni imposte. Siccome lo studio di queste varianti serve come metodo efficiente per valutare lo stato di "stress" in varie specie è probabile che lo stesso non sia avvenuto o se è avvenuto non ha alterato il ritmo fisiologico normale degli animali sottoposti alla prova. Sugeriamo di conseguenza, per eventuali ricerche che includano lo stato di "stress", che siano studiati, oltre agli effetti qui ricercati, la presenza istochimica nella corrente sanguigna di agenti indicatori di questa anomalia fisiologica, a dire il colesterolo, glicosi, urea, ACTH e corticosteroidi oltre ad altri importanti.

REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

- CANNON, W.B. Bodily Changes in Pain Hunger, Fear and Rage. 2.ed. Boston, C.T. Brandford Company, 1929.
- FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.S. & MAGALHÃES, L.M. Patologia Clínica Veterinária. Belo Horizonte, Rabelo, 1981. 279 p.
- FISHER, R.A. & YATES, F. Tabelas estatísticas para pesquisa em biologia, medicina e Agricultura. São Paulo, Universidade de São Paulo e Polígono, 1971. 150 p.
- FRASER, D.; RITHIE, J.S. D. & FRASER, A.F. The term "stress" in a veterinary context. Brit. Vet. J., London, 131 (6):653-62, 1975.
- FRIEND, T.H. Stress: What is it and how cant'be quantified ? Int. J. Study of Anim. Probl., 1(6):366-74, 1980.
- HOLM, L.W.; HOWARTH, J.A. & KELLEHER, J. The effect of cortisone on normal sheep. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 12(45):314-19, 1951.
- HOPWOOD, R.T. & TIBOLLA, B.J. The effects of adrenocorticotrophic hormone on the circulating eosinophil level. A possible screening test for adrenal gland function in the cow. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 19 (11).833-35, 1958.
- JACOBSON, H.A.; KORKPATRICK, R.L.; BURKAART, H.E. & DAVIS, J.W. Hematologic comparisons of shot and live trapped cottontail rabbits. J. Wildlife Dis., Ames, 14(1):82-98, 1978.
- JECHE, M. Significance of sociological factors in animal husbandry and the role of adrenal cortical function. Zoologische garten, Jena 50(5): 337-44, 1980.
- KOSTSCHE, W. & GÖTTSCHALK, C. Enfermedades del conejo y de la liebre. Zaragoza, Acribia, 1974. 299 p.
- LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J. & CANÇADO, R. J. Métodos de laboratório aplicados à clínica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1969. 653 p.
- LUKE, D. The effect of adrenocorticotrophic hormone and adrenal cortical extract on the differential with cell count in the pig. Brit. Vet. J., London, 109(10):434-40, 1953

- ROSSADALE, P.D.; BURGUEZ, P.N. & CASH, R.S.G. Changes in blood neutrophil/lymphocyte ratio related to adrenocortical function in the horse. Equine Vet. J., Kent, 14(4):293-98.
- SALEH, S.Y. & JAKSCH, W. The effect of stress factors on blood leucocytic count, glucose and corticoids in chickens. Zbl. Vet. Med. Hamburg, 24A(2): 220-28, 1977.
- SCOTT, G.H. What is animal stress and how is it measured? J. Anim. Sci., Champaign, 52(1):150-53, 1981.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. Nature, London, 138 (1):32, 1936.
- SILVA, R.M.; FERREIRA NETO, J.M. & SAMPAIO, I.B.M. Variações leucocitárias através do teste de THORN em zebu (Bos indicus) Arq. Esc. Vet. UFMG., Belo Horizonte, 32 (2): 235-40, 1980.
- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W. Statistical methods. 6 ed., Ames, The Iowa State College Press, 1967. 592 p.
- WEGNER, IN., SCHUH, J.D.; NELSON, F.E. & SCOTT, G.H. Effect of stress on blood leucocyte and milk somatic cells counts in Dairy Cows. J. Dairy Sci., Champaign, 59(5):949-56, 1974.
- YOUNG, B.A. Cold stress as it affects animal production. J. Anim. Sci., Champaign, 52(1):154-63, 1981.

RIASSUNTO

Sono stati utilizzati 108 conigli, 54 maschi e 54 femmine della razza Nuova Zelanda Bianca, svezzati ai 28 giorni d'età e sottoposti a un periodo pre-sperimentale di 7 giorni e sperimentale di 6 settimane, collocati in gabbie di metallo di 0,6 x 0,6 x 0,375 m nel sistema "Flat-deck" in capannone semi aperto. La temperatura ambientale fu di 28,68 + 2,64°C la massima, e di 21,45 + 1,81°C la minima con una umidità di 66,83 + 97,9%. Le densità popolazionali furono di 1200, 900, 720 e 600 cm² per ogni sesso e animale con 3 ripetizioni per prova con l'obiettivo di sapere se nelle condizioni imposte, lo stato di "stress" fisiologico, potesse essere evidenziato attraverso conteggi globali e differenziali di leucociti circolanti al termine del periodo sperimentale. Le analisi delle variazioni nei conteggi globali e differenziali dimostrano che gli effetti provocati per la densità, sesso e interazione sesso x densità non furono statisticamente significativi (P < 0,05). Probabilmente lo stato di "stress" non avvenne in modo da alterare il ritmo fisiologico degli animali usati oppure non è apparso il fenomeno nelle densità usate.

SUMMARY

Hundred-and-eight White New Zealand rabbits (54 males and 54 females), weaned at 28 days of age, were submitted to pre-experimental and experimental periods of 7 days and 6 weeks, respectively. The rabbits were housed in 0.6 x 0.6 x 0.375 m wire cages, under the Flat Deck system, in semi-open brick pens. Both sexes were assigned to 4 treatments, each with 3 replicates, with a density of 1200, 900, 720 and 600 cm² per rabbit. The aim of the experiment was to evaluate whether under the present conditions, the physiological stress could be detected through the total and differential leukocyte counts at the end of the experimental period. The analyses of variance showed that density, sex and the interaction density x sex had no significant

effects on the total and differential leukocyte counts ($P < 0,05$). It might be concluded that stress caused no change in the physiological ritmes of the tested animals and even the phenomenon in the evaluated densities might not have occurred.

