

Analisi di immagini termiche per la valutazione del benessere animale: uno studio quadriennale sulla specie cunicola presso l'Università degli Studi di Milano

Ludwig N.¹, Gargano M.¹, Redaelli V.², Luzi F.², Verga M.²

¹Istituto di Fisica Generale Applicata, Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e
Naturali, Università degli Studi di Milano

²Dipartimento di Scienze Animali, Sezione di Zootecnica Veterinaria, Università degli
Studi di Milano

Corresponding author: Dott. Nicola Ludwig, Dipartimento di Fisica, Facoltà di Scienze
Matematiche Fisiche e Naturali, Università degli Studi di Milano.

Tel. 0250317486 – Fax: 0250317422 – E-mail: nicola.ludwig@unimi.it

RIASSUNTO – Da 4 anni si è verificata la possibilità di applicazione di un nuovo metodo non invasivo di controllo di eventuali condizioni di stress, basato sulla termografia a distanza, che utilizza la già accertata dipendenza della temperatura corporea dell'animale da accentuate condizioni di disagio ambientale. Il coniglio è presente nei laboratori scientifici ma soprattutto negli allevamenti; questi animali, se allevati in condizioni non sufficientemente confortevoli, mostrano un marcato aumento della morbilità e un minore ritmo di riproduzione. Su una popolazione totale di 12 animali analizzati per ogni anno è stata eseguita l'elaborazione di più di 500 immagini corrispondenti alle misure eseguite sia in fase di stress che di riposo (condizione basale). I risultati mostrano un buon grado di ripetibilità e forniscono una ragionevole aspettativa sulla possibilità di utilizzare effettivamente questo metodo in condizioni di controllo di *routine*.

INTRODUZIONE – Questo studio parte dalla notevole attenzione che si è sviluppata negli ultimi anni verso le condizioni di vita, quindi di “adattamento” e di “benessere” degli animali tenuti in cattività. In particolare, esistono normative europee relative alle condizioni di allevamento e gestione degli animali da parte dell'uomo. Esistono inoltre normative europee specifiche relative all'allevamento di alcune specie domestiche, quali ad esempio, vitelli, suini ed ovaiole. Tuttavia non sono ancora presenti, a livello europeo, normative riguardanti il benessere di conigli allevati intensivamente; al contrario, questi animali sono inclusi in una Direttiva relativa agli animali da laboratorio.

Il coniglio è presente nei laboratori scientifici ma soprattutto negli allevamenti; questi animali, se allevati in condizioni non sufficientemente confortevoli, mostrano un marcato aumento della morbilità e un minore ritmo di riproduzione. Vi è quindi anche un diretto interesse economico nel garantire buone condizioni di vita per i conigli d'allevamento.

Da 4 anni presso l'istituto di Fisica Generale Applicata e il Dipartimento di Scienze Animali, Sezione di Zootecnica Veterinaria si è verificata la possibilità di applicazione di un nuovo metodo non invasivo di controllo di eventuali condizioni di stress, basato sulla termografia a distanza, che utilizza la già accertata dipendenza della temperatura corporea dell'animale da accentuate condizioni di disagio ambientale (Blessing e Seaman, 2003; Vianna e Carrive, 2005). In particolare, nel caso del coniglio: stati di

paura possono essere generati da costrizioni in gabbie ristrette o rumori improvvisi, oppure dal condizionamento atavico di una temuta presenza di predatori.

A causa della pelliccia che ricopre completamente questo animale, le possibilità di rilievo della temperatura corporea, si riducono in pratica all'occhio, alla parte interna dell'orecchio e alla mucosa nasale. Per quest'ultima, le condizioni di umidità estremamente variabili possono alterare il valore effettivo della temperatura.

L'informazione sulle variazioni di temperatura delle zone prescelte deve essere ottenuta dall'analisi dell'immagine termografica con una precisione sufficiente a rilevare differenze di temperature dell'ordine di alcuni decimi di grado. La ripresa termografica presenta inoltre difficoltà caratteristiche, dipendenti dal soggetto, ripreso sia in condizioni di stress indotto sia in condizioni normali. Infine, le procedure di analisi dell'immagine devono essere adatte perché siano eseguibili con un sistema automatico di controllo che risulti affidabile. Il riscontro dell'effettivo verificarsi delle condizioni di stress durante lo studio si è ottenuto mediante il controllo della presenza nel sangue dell'ormone corticosterone e dell'enzima lisozima, effettuato mediante prelievo ematico.

È stato poi sviluppato uno specifico *software* per l'analisi delle immagini termografiche, allo scopo di superare il problema dovuto al movimento del soggetto e alla necessità di definire con precisione la corrispondenza tra zona da analizzare (inferiore al cm² per l'occhio e dell'ordine di alcuni cm² per l'orecchio) e l'insieme di *pixels* corrispondenti nell'immagine digitale. Il problema specifico consiste nell'identificare le zone significative per il rilievo della temperatura, con un metodo che possa essere eseguito con procedure automatiche, pur non potendo basarsi sull'utilizzo di coordinate spaziali per l'identificazione della zona da analizzare. Su una popolazione totale di 12 animali analizzati per ogni anno è stata eseguita l'elaborazione di più di 500 immagini corrispondenti alle misure eseguite sia in fase di stress che di riposo (condizione basale). I risultati mostrano un buon grado di ripetibilità e forniscono una ragionevole aspettativa sulla possibilità di utilizzare effettivamente questo metodo in condizioni di controllo di *routine*.

PROCEDURE PER LA MISURA DELLA TEMPERATURA SU CONIGLI

Prima fase: misura della temperatura basale – Con il termine “misura basale” si intende una misura della temperatura in condizioni di riposo e in assenza di stress. Gli animali vengono inizialmente trasferiti in gabbie di dimensioni maggiori (0,50 m x 0,60 m x 0,60 m) rispetto ai loro alloggi abituali, dove vengono osservati per un tempo di almeno 30 min (in alcuni casi fino a 45 min) durante i quali avviene la prima fase sperimentale di ripresa termica (un fotogramma/min) in condizioni dette di riposo cioè in assenza di rumori, di operatori e interazioni con l'ambiente esterno (eccettuata l'operazione di trasferimento nelle gabbie). In tutti i casi osservati, gli animali mostrano uniformità di comportamento: inizialmente essi esplorano l'ambiente nuovo e, successivamente, constatata l'assenza di pericolo, trovano la posizione più comoda all'interno dello spazio a loro disposizione. Il collocamento in nuove gabbie, durante questa fase, è necessario per una corretta ripresa con la termocamera.

La “misura basale” è certamente la fase più critica della misura poiché la difficoltà delle riprese effettuate da lontano (distanza di 3 m), unita alla possibilità di movimento dell'animale, rende la misura particolarmente sensibile a eventi come il posizionamento dell'animale, con la struttura metallica della gabbia posta tra l'obiettivo della termocamera e le aree di interesse (Figura 1).



Figura 1: Occhio parzialmente coperto dalla gabbia metallica.

Ciò provoca problemi in fase di individuazione di tali aree da parte del *software*. Tuttavia grazie alle speciali gabbie progettate per questo tipo di riprese solo una piccolissima parte delle immagini (circa 20 fotogrammi su più di 500) è risultata inutilizzabile per l'elaborazione.

Le principali problematiche di ripresa sono state:

- **Distanza:** La zona oculare degli animali occupa solo pochi pixel nell'immagine termica a causa della distanza tra termocamera e conigli. Questo problema è eliminabile riducendo la distanza di osservazione; la presenza ravvicinata della strumentazione, non è da considerarsi una ulteriore fonte di stress : il coniglio si adatta facilmente all'ambiente e ad una presenza non invasiva dell'operatore e della termocamera.
- **Movimento del soggetto:** La posizione della testa del coniglio rispetto all'obiettivo della termocamera rende difficile, in alcuni casi, il riconoscimento della zona oculare e auricolare da parte del *software*. (Figura 2) In qualche caso il risultato proposto dal programma non è di alcuna utilità anche se la frequenza di tale casistica è rara. Tale problema non è risolvibile senza ricorrere alla costrizione dell'animale, causando stress non voluto durante la misura basale.

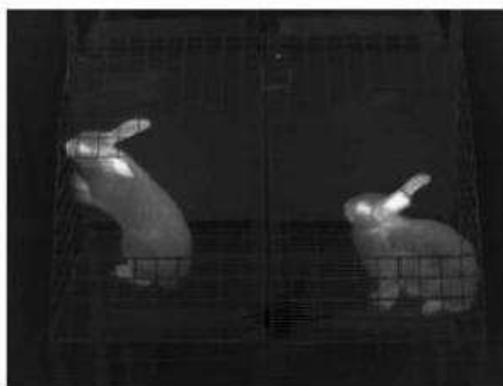


Figura 2: La griglia metallica della gabbia è visibile solo se interposta tra coniglio e obiettivo della termocamera.

Vengono riportate nei grafici seguenti (Figura 3), a titolo di esempio, una serie di misure della temperatura superficiale relativa ad un singolo coniglio, sia per l'occhio sia per l'orecchio.

All'interno della stessa serie di misure e relativamente alla stessa condizione, si nota una marcata variabilità dei valori della temperatura misurata. Tale variabilità è imputabile sia a risposte fisiologiche, dovute a reazioni immediate generate da uno stato di paura per esempio per effetto di rumori improvvisi, sia alla difficoltà di ripresa causata dal movimento dell'animale.

Si noti dalla figura (misure 5 e 6 della misura basale dell'orecchio) che i valori di temperatura corrispondenti a due fotogrammi consecutivi possono differire fino a un valore dell'ordine di 1°C. Ne consegue che la possibilità di successo per l'applicabilità del metodo risiede necessariamente nel riferirsi al valore medio delle misure riprese in un opportuno intervallo di tempo. Nel nostro caso sono state calcolate le medie su circa 30 misure consecutive eseguite alla frequenza di una al minuto.

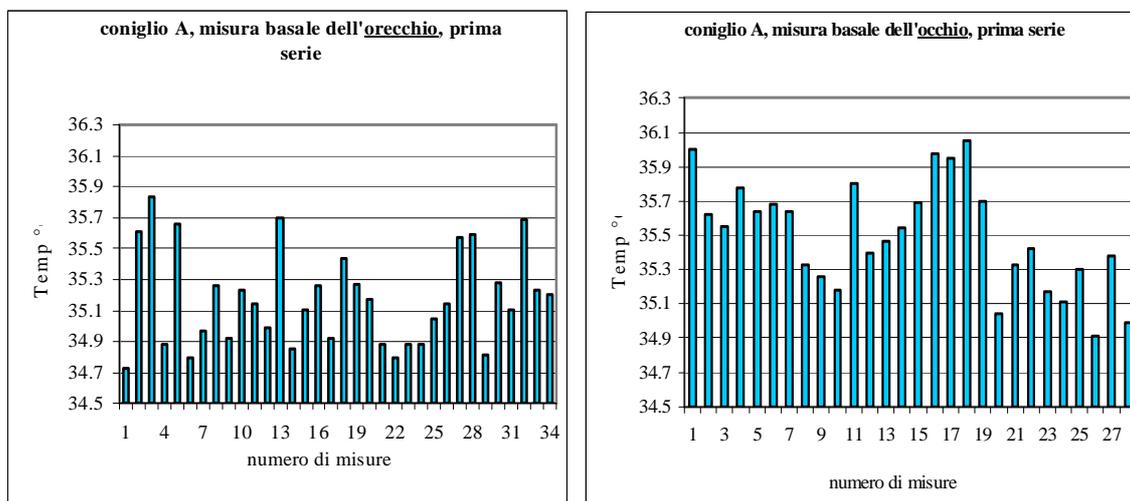


Figura 3: Due esempi di immagini riprese durante la fase di stress.

Seconda fase: stress indotto – Durante questa fase l'animale viene collocato in speciali gabbie di contenimento per facilitare la misura della temperatura corporea interna, (Figura 4) tramite termometro a mercurio, e il prelievo del sangue. Certamente questa è la fase in cui l'animale subisce la maggiore fonte di stress: la misura della temperatura interna tramite termometro in posizione rettale, il contenimento in gabbia e il prelievo ematico sono considerate fonti di stress ripetibili su ogni individuo con le stesse modalità di esecuzione.



Figura 4: Coniglio nella struttura di contenimento

Le modalità di ripresa dei fotogrammi, in questa fase, non comportano le difficoltà di mobilità dell'animale, precedentemente discusse; sono stati scattati tre fotogrammi: uno prima della misura della temperatura interna, il secondo nel periodo di tempo intercorrente tra misura e prelievo ematico e l'ultimo alla fine dell'operazione di prelievo (Figura 5).

Per rendere significativo il risultato sono state effettuate due serie di misure in giorni diversi sugli stessi soggetti, a parità di condizioni ambientali (temperatura e umidità relativa, alimentazione, management e gabbie) e procedure sperimentali (tipologia e durata delle misure, presenza degli stessi operatori). Inoltre, l'intero esperimento è stato ripetuto per tre anni consecutivi su popolazioni di medesima entità (8-12 conigli). Esiste

comunque una variabilità nelle misure imputabile alla differente risposta fisiologica dei singoli individui.

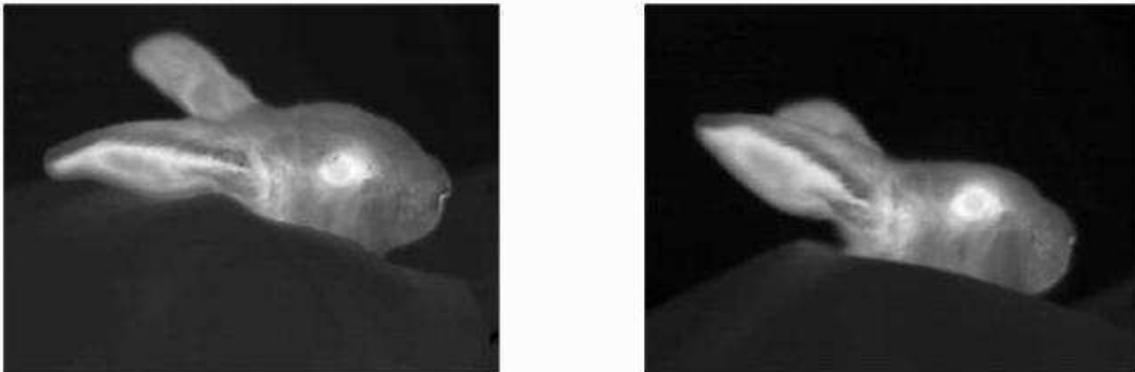


Figura 5: Due esempi di immagini riprese durante la fase di stress.

CONSIDERAZIONI SULLA PRECISIONE DEL METODO – L'affidabilità del metodo descritto dipende dalla precisione della misura in quanto ciò che è significativo è la variazione relativa di temperatura tra condizione basale e condizione di stress. Come già detto, misure ripetute in condizioni idealmente identiche mostrano in effetti una dispersione notevole che è imputabile a diversi fattori sperimentali collegabili alle particolari condizioni della misura; pertanto, il dato significativo è necessariamente il valor medio della serie di misure eseguite su ciascun animale. Notiamo, a questo proposito, che se per la condizione basale è ragionevole considerare che misure in condizioni identiche possano essere eseguite in un arco di tempo relativamente lungo, al contrario, non è ipotizzabile che una condizione di stress si prolunghi per più di pochi minuti. Ciò ha come conseguenza che l'errore da attribuire al valor medio della temperatura nella condizione di stress sarebbe maggiore che per la temperatura in condizione basale tuttavia ciò è compensato dalla maggiore accuratezza di misure fatte dall'operatore a distanza ravvicinata. Si è deciso in entrambi i casi di attribuire come errore alla media la precisione dello strumento; cioè l'errore sulla singola misura, secondo le specifiche tecniche della termocamera TVS-700, che è pari a 0.08°C . Con ulteriore sovrastima, i dati sperimentali di temperatura sono riportati con l'approssimazione di un decimale in questo modo si è adottato un criterio conservativo basato su una sovrastima dell'errore reale. Tuttavia, volendo formulare un giudizio realmente affidabile di applicabilità del metodo, è necessario tenere in considerazione che in ipotetiche condizioni di routine, e con personale non perfettamente addestrato, bisogna aspettarsi che la precisione delle misure possa essere inferiore a quella raggiunta nel nostro caso.

RISULTATI – I grafici seguenti riportano i valori di temperatura determinati come sopra specificato, sia per l'occhio che per l'orecchio, per i 12 conigli analizzati e contrassegnati da A ad N, per i quali l'errore indicato è di un decimo di grado.

I grafici 1 e 2 rappresentano i risultati ottenuti in due serie di misure a distanza di circa un mese una dall'altra. Il grafico 3 rappresenta il risultato ottenuto dalla media delle due serie.

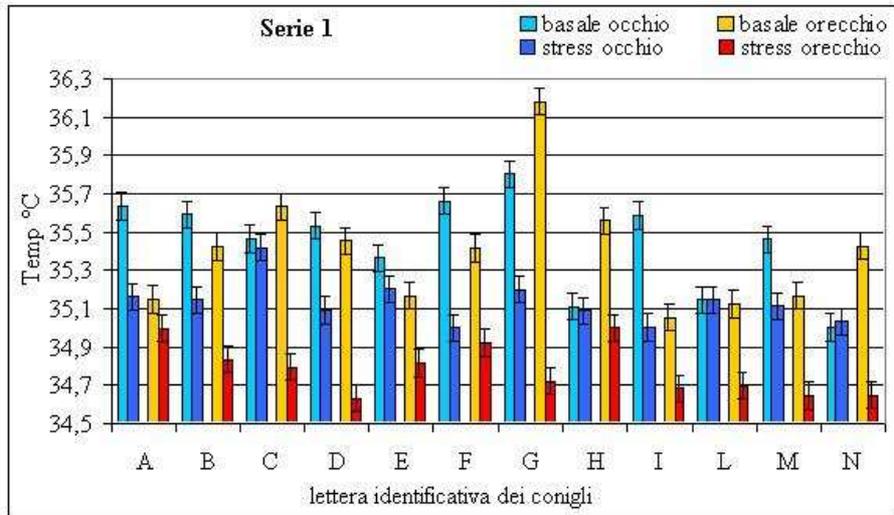


Grafico 1

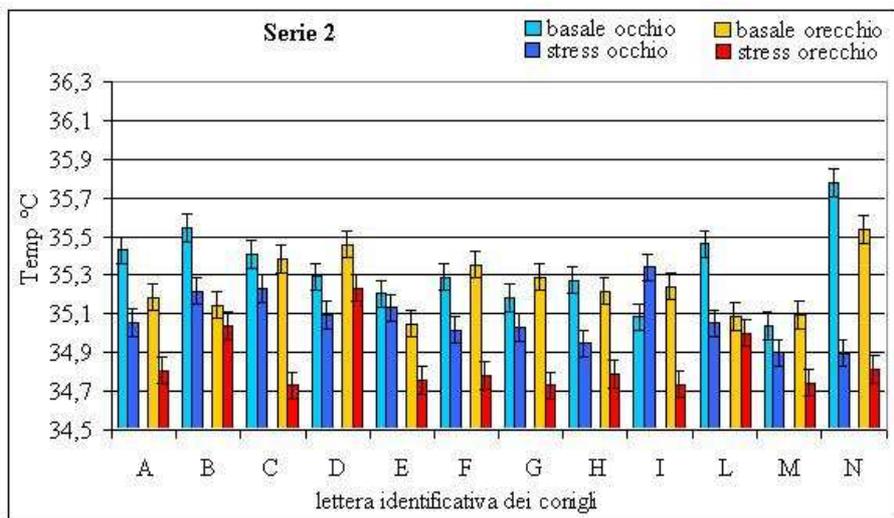


Grafico 2

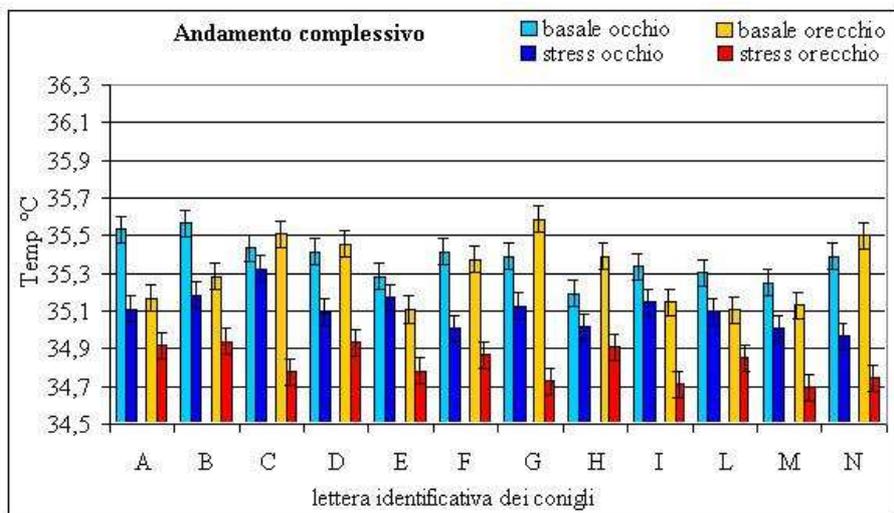


Grafico 3

Da tali grafici si evince un comportamento in generale costante: è ben visibile una diminuzione della temperatura oculare e auricolare, per effetto della vasocostrizione, nella condizione di stress rispetto a quella basale. Si noti che la determinazione della differenza di temperatura non sembra affidabile per l'occhio, perché le differenze tra temperature in condizione basale e quelle in condizione di stress nel 30% circa dei casi sono minori degli errori sperimentali (anche se sovrastimati come già detto). Esistono casi isolati, ad esempio i conigli I nella prima serie di misure e N nella seconda, per i quali la temperatura oculare sembra aumentare in condizioni di stress. Sebbene si noti una forte disomogeneità di comportamento tra i singoli individui, come risultato generale si ha che le variazioni di temperatura dell'orecchio sono maggiori di quelle dell'occhio. Per questo motivo e per le dimensioni maggiori dell'orecchio rispetto all'occhio, la zona auricolare è da ritenersi più adatta per determinare lo stress nel coniglio tramite analisi termografiche. Utilizzando delle metodiche di laboratorio standardizzate per il rilievo di un'eventuale sintomatologia di stress, è stata titolata la quantità di Corticosterone e Lisozima nel siero del sangue dei soggetti. Escludendo il caso anomalo del coniglio B, (i dati relativi al coniglio A non sembrano significativi poiché la differenza tra le concentrazioni in fase basale e di stress è minore dell'errore, assunto pari a 5 ng/ml), ne segue che circa il 75% delle misure può essere considerata attendibile. L'aumento dei livelli di corticosterone e lisozima rilevato, conferma quindi la presenza effettiva di uno stato di stress.

CONCLUSIONI – I dati ottenuti durante le diverse fasi sperimentali tramite rilievi termografici consentono di ritenere tale metodologia un'opzione interessante per evidenziare, in modo non invasivo, situazioni di stress negli animali.

BIBLIOGRAFIA – **Blessing**, W.W., Seaman, B., 2003. 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptors regulate sympathetic nerves constricting the cutaneous vascular bed in rabbits and rats. *Neuroscience* 117:939-948. **Ludwig**, N., Gargano, M., Luzi, F., Carezzi, C., Verga, M., 2006. Applicability of I.R. thermography to the measurement of stress in rabbit. In: Proc. 8th Int. Conf. Quant. InfraRed Therm., Padova, Italy. **Ludwig**, N., Gargano, M., Luzi, F., Carezzi, C., Verga, M., 2007. Applicability of infrared thermography as a non invasive measurement of stress in rabbits. *World Rabbit Sci.* 15:199-206. **Vianna**, D.M.L., Carrive, P., 2005. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. In: Proc. Aust. Neuroscience Soc. 21:2505-2512.

