

*Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, **Zakład Prewencji Weterynaryjnej,
*** Zakład Biochemii Katedry Biochemii i Fizjologii Zwierząt,
**** Katedra Anatomii i Histologii Zwierząt
Akademii Rolniczej w Lublinie

STANISŁAW TOKARZEWSKI*, ANDRZEJ WERNICKI**,
MARTA KANKOFER***, RENATA URBAN-CHMIEL**,
MARCIN ARCISZEWSKI****

*Transport jako czynnik wzmagający reakcje stresowe
u brojlerów kurzych*

Transport of chicken broilers as an agent increased stress response

STRESZCZENIE

Intensywna produkcja zwierząt, a zwłaszcza drobiu, w istotny sposób sprzyja występowaniu sytuacji stresowych. Powszechnie znany jest fakt niekorzystnego wpływu stresu na organizm ptaków, prowadzący do wzrostu zachorowalności na skutek zakłóceń odpowiedzi immunologicznej. W wyniku tego nawet słabo patogenne drobnoustroje mogą przyczyniać się do występowania infekcji i rozwoju klinicznego obrazu choroby. Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu transportu jako czynnika wzmagającego reakcje stresowe u brojlerów kurzych.

Badania wykonano na 2 grupach ptaków rasy Ross 308 w wieku 14 i 30 dni, z których każda liczyła 5 sztuk. Ptaki były klinicznie zdrowe, wolne od pasożytów oraz wolne od zakażeń pałeczkami *Salmonella* spp. Podczas doświadczenia każdą sztukę przetrzymywano w oddzielnej klatce. Ptaki transportowano 5 godzin na odległość 180 km. Materiał do badań stanowiły rozmazy krwi oraz krew pobrana z żyły skrzydłowej przed transportem, bezpośrednio po transporcie oraz na 2 dni po transporcie. W celu określenia natężenia stresu obliczono stosunek heterofilów do limfocytów (H/L), który u ptaków jest podstawowym wskaźnikiem stresu. W próbkach surowic oznaczono stężenie białka całkowitego przy wykorzystaniu reakcji biuretowej przy długości fali 546 nm. Stężenie kortyzolu w surowicach określono testem ELISA, po zastosowaniu ekstrakcji eterowej metodą Möstla i in. oraz Palme'a i in. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej testem t-Studenta.

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono statystycznie istotny wzrost H/L ($p < 0,05$) w obydwu grupach brojlerów bezpośrednio po transporcie. Wykazano nieznaczny wzrost stężenia białka całkowitego zarówno u ptaków w wieku 14, jak i 30 dni, szczególnie widoczny w 2. dniu po transporcie. W surowicach 14- oraz 30-dniowych brojlerów kurzych zaobserwowano statystycznie istotny wzrost ($p < 0,05$) stężenia kortyzolu po transporcie w porównaniu z wartościami uzyskanymi przed transportem. Otrzymane w badaniach własnych istotny wzrost poziomu H/L oraz kortyzolu w surowicach przewożonych brojlerów kurzych świadczy o przebiegu reakcji stresowej wywołanej czynnikami związanymi z transportem.

Słowa kluczowe: stres transportowy, brojlery kurze, współczynnik H/L, kortyzol, białko całkowite

WSTĘP

Jednym z czynników związanych z aktualnie stosowanymi systemami produkcji drobiu jest transport. Odbywa się on w różnych okresach życia ptaków, tj. od bardzo młodych (jednodniowe pisklęta), poprzez intensywnie tuczone (brojlery), aż po osobniki dojrzałe (nioski towarowe lub reprodukcyjne).

Transport, niezależnie od tego, w jaki sposób jest przeprowadzany, stanowi dla przewożonych ptaków ogromny czynnik stresowy. Oddziałując bezpośrednio na organizm zwierząt, powoduje powstawanie niekontrolowanej reakcji stresowej.

Przyczynami strat zwierząt hodowlanych i rzeźnych, w tym drobiu, podczas transportu są nieodpowiednie warunki i zmęczenie zwierząt, wynikające z niewłaściwej organizacji. Istotny wpływ odgrywa także stres psychiczny oraz cieplny. Straty ujawniają się w postaci spadku masy ciała, zachorowań oraz padnięć przewożonych zwierząt. Przewóz w porze letniej powoduje większe zmęczenie niż transport zimą. Na stopień zmęczenia wpływa także sposób chowu ptaków w okresie poprzedzającym transport, np. brojlery, które zgodnie z cyklem produkcyjnym utrzymywane są na ograniczonej przestrzeni, nieprzystosowane do swobodnego ruchu męczą się szczególnie łatwo. Innym ważnym czynnikiem jest masa ciała. Wielkość ubytku ciężaru przewożonych ptaków nie jest stała i ulega zmianie w zależności od przynależności gatunkowej, sposobu i czasu trwania przewozu, systemu odżywiania w okresie poprzedzającym transport, stopnia utuczenia, pory roku oraz powierzchni klatek.

Przewożone ptaki podlegają na ogół bardzo silnemu stresowi psychicznemu, który zależy od obsługi i przygotowania środków transportu [Möstl i in. 1999, Graczyk i in. 2003]. Bardzo istotnym czynnikiem stresowym jest strach, powstały w wyniku oddzielenia ptaków od ich dotychczasowego miejsca bytowania.

Każdemu stresowi, a szczególnie psychicznemu, towarzyszy nadmierne wydzielanie hormonów korykotropowych, które działając supresyjnie na układ odpornościowy, powodują zwiększoną wrażliwość organizmu na zakażenia bakteriami endogennego pochodzenia [De Jong i in. 2001].

U zwierząt gospodarskich głównymi kortykoidami są kortyzol, kortyzon i aldosteron, natomiast u ptaków i gadów podstawowym hormonem korowo-nadnerczowym jest kortykosteron, którego koncentracja jest 100-krotnie większa niż kortyzolu [Palme i in. 1999, Puvadolpirod i Thaxton 2000, De Jong i in. 2001]. Metabolizm poszczególnych hormonów sterydowych w korze nadnerczy jest kierowany enzymatycznie. Przyjmuje się, że układy enzymatyczne są podobne u wszystkich kręgowców, różnice występują natomiast w ilości poszczególnych hormonów.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu czynników związanych z transportem ptaków na podstawowe parametry stresu u brojlerów kurzych.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na 2 grupach 14- i 30-dniowych ptaków rasy Ross 308, z których każda liczyła 5 sztuk. Brojlery kurze pochodziły z ferm zlokalizowanych w okolicach Lublina. Ptaki były klinicznie zdrowe, wolne od pasożytów oraz zakażeń pałeczkami *Salmonella* spp. Podczas doświadczenia każdą sztukę przetrzymywano w oddzielnej klatce. Ptaki przewożono 5 godzin na odległość 180 km. Po przybyciu na miejsce, brojlery były w dobrej kondycji oraz cechowały się charakterystycznym dla tego gatunku ptaków behawiorem. U transportowanych ptaków nie obserwowano żadnych klinicznie uchwytanych objawów chorobowych.

Materiał do badań stanowiła krew pobrana z żyły skrzydłowej przed transportem, bezpośrednio po jego zakończeniu oraz na 2 dni po transporcie. Po wykonaniu rozmazów próbki krwi wirowano, a uzyskane surowice przechowywano w temperaturze -20°C .

W uzyskanych rozmazach obliczono stosunek heterofilów do limfocytów (H/L) metodą Collette'a i in. [2000]. Rozmazy oglądano pod mikroskopem Nikon, w powiększeniu 600x.

W próbkach surowic oznaczono stężenie białka całkowitego, wykorzystując reakcję biuretową (Cormay Total protein 60) i używając fotomertu LP 400 (Dr Bruno Lange, GmbH) przy długości fali 546 nm.

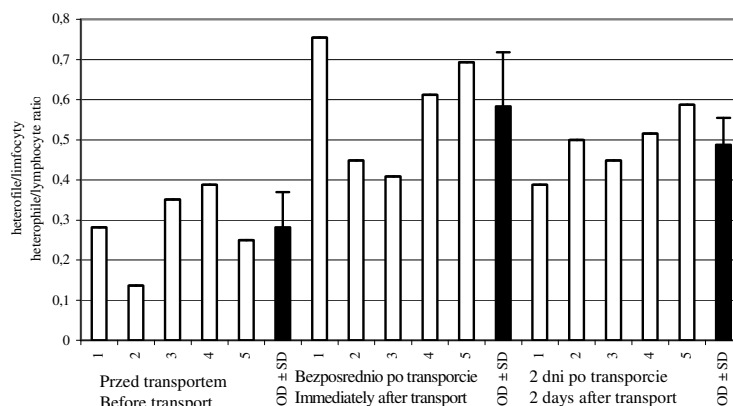
Stężenie kortyzolu w surowicach określono testem ELISA (uzyskany dzięki uprzejmości prof. Ericha Möstla z Uniwersytetu Weterynaryjnego w Wiedniu), po zastosowaniu ekstrakcji eterowej metodą Möstla i in. [1999] oraz Palme'a i in. [1999]. Absorbancja próbek była odczytywana bezpośrednio po zakończeniu testu, przy użyciu czytnika do mikroplitek Labsystem Multiskan RC, z zastosowaniem filtrów o długościach fal 450 oraz 620 nm.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej testem t-Studenta z wykorzystaniem programu Statistica 6.0.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Transport jako jeden z podstawowych czynników stresowych oddziałuje modulująco na humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną zwierząt. Intensywność tego oddziaływania uzależniona jest głównie od czasu trwania transportu, pory dnia, zastosowanego środka transportu, warunków środowiskowych, a także kondycji i wieku przewożonych zwierząt.

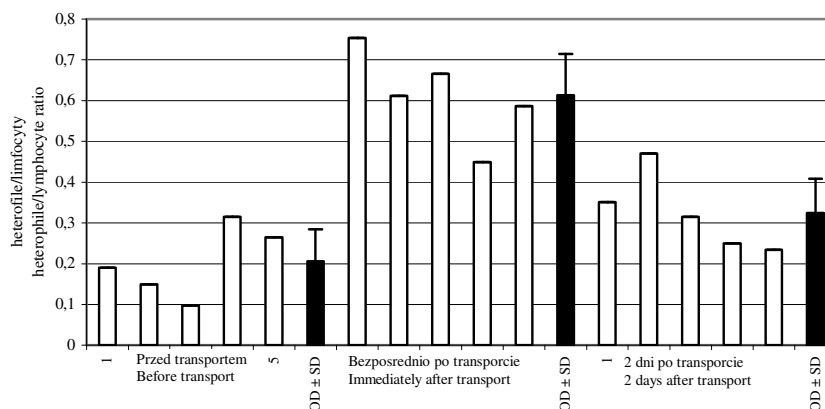
Podstawowym wskaźnikiem nasilenia reakcji stresowej u ptaków jest stosunek heterofilów do limfocytów (H/L) [McFarlane i Curtis 1989, al-Murrani i in. 1997]. Według Grossa i Siegla [1983] wskaźnik ten można uznać za bardziej wiarygodny i obiektywny wyznacznik stresu niż poziom hormonów sterydowych w surowicy. Jak wykazano na rys. 1, w rozmazach pochodzących od 14-dniowych brojlerów kurzych znaczący wzrost ($p < 0,05$) współczynnika H/L uzyskano bezpośrednio po transporcie ($0,614 \pm 0,102$) w porównaniu z wartościami uzyskanymi przed transportem ($0,206 \pm 0,078$). Podobną tendencję wykazano także u 30-dniowych ptaków (rys. 2). W 2. dniu po transporcie wartości H/L w obu badanych grupach ptaków uległy obniżeniu w stosunku do wartości uzyskanych bezpośrednio po transporcie. Spadek ten był jednak niższy dla ptaków w wieku 14 dni ($0,324 \pm 0,085$) niż u brojlerów kurzych w wieku 30 dni ($0,488 \pm 0,067$ – rys. 1,



Rys. 1. Wartości średnie H/L (OD ± SD) u 14-dniowych brojlerów kurzych

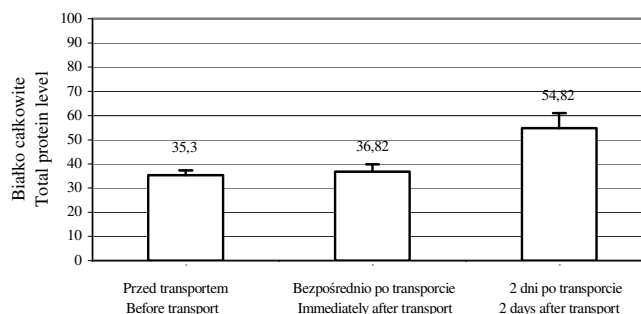
Fig. 1. Mean H/L ratio (OD ± SD) obtained from 14 day-old broilers

rys. 2). Podobne wyniki uzyskali Mills i in. [1993] u przepiórek japońskich, u których wzrost wartości H/L nastąpił po 3 godzinach od zadziałania czynnika stresowego, zbliżając się następnie do wartości uzyskanych u ptaków z grupy kontrolnej. Także Gross i Siegel [1983] stwierdzili znaczny wzrost współczynnika H/L po wywołaniu stresu u brojlerów kurzych w stosunku do wartości kontrolnych. Podobną tendencję obserwowano również w odpowiedzi na stres u innych gatunków ptaków. Z kolei u papużek Amazonek poddanych stresowi (łapanie ptaków) stwierdzono jedynie nieznaczny wzrost wartości współczynnika H/L w stosunku do wartości kontrolnych [Collette i in. 2000].

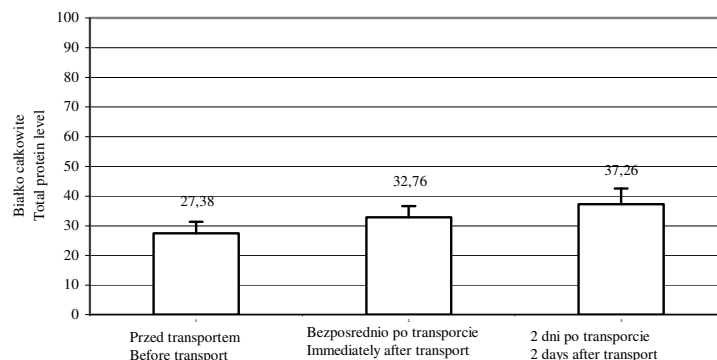


Rys. 2. Wartości średnie H/L (OD ± SD) u 30-dniowych brojlerów kurzych
Fig. 2. Mean H/L ratio (OD ± SD) obtained from 30 day-old broilers

W obu grupach wiekowych ptaków zaobserwowano bezpośrednio po transporcie oraz 2 dni po transporcie wzrost stężenia białka całkowitego surowicy (rys. 3, 4). Uzyskane wartości dla brojlerów 14-dniowych kształtowały się następująco: 35,30, 36,82, 54,82 g/l, natomiast dla 30-dniowych wynosiły odpowiednio: 27,38, 32,76, 37,26 g/l. Uzyskane rezultaty są zgodne z wynikami przedstawionymi przez Puvadolpiroda i Thaxtona [2000].



Rys. 3. Średnie stężenie białka całkowitego w g/l (OD±SD) u 14-dniowych brojlerów kurzych
Fig. 3. The mean total protein level in g/l (OD±SD) obtained from 14 day-old broilers



Rys. 4. Średnie stężenie białka całkowitego w g/l (OD±SD) u 30-dniowych brojlerów kurzych
Fig. 4. The mean total protein level in g/l (OD±SD) obtained from 30 day-old old broilers

W surowicach uzyskanych od transportowanych 14-dniowych brojlerów kurzych obserwowano statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) w poziomie kortyzolu w porównaniu z wartościami uzyskanymi przed transportem. Średnie stężenie kortyzolu oznaczone przed transportem wynosiło $7,405 \pm 2,89$ nmol/ml, natomiast w surowicach uzyskanych od zwierząt bezpośrednio po transporcie wartość ta była równa $28,068 \pm 1,842$ nmol/ml, a u ptaków w 2. dniu po transporcie wynosiła $8,948 \pm 3,007$ nmol/ml (tab. 1).

Tabela 1. Średnie stężenie kortyzolu w nmol/l (OD±SD) w surowicach pochodzących od 14-dniowych brojlerów kurzych

Table 1. The mean cortisol concentration in nmol/l (OD±SD) in serum obtained from 14 day-old broilers

Nr brojlera No of broiler	Przed transportem Before transport	Bezpośrednio po transporcie Immediately after transport	2 dzień po transporcie 2 days after transport
1.	3,186	28,252	6,848
2.	6,102	25,174	5,502
3.	7,668	27,766	8,748
4.	10,044	29,062	10,530
5.	10,024	30,088	13,112
OD±SD	$7,405 \pm 2,89$	$28,068^* \pm 1,842$	$8,948^{**} \pm 3,007$

* Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) w porównaniu z grupą przed transportem.

Significant differences at $p < 0.05$ compared to group before transport.

** Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) w porównaniu z grupą po transporcie.

** Significant differences at $p < 0.05$ compared to group immediately after transport.

U 30-dniowych brojlerów kurzych również obserwowano statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) w poziomie stężenia kortyzolu w porównaniu z wartościami uzyskanymi przed transportem. Średnie stężenie kortyzolu oznaczone przed transportem wynosiło

4,931±1,879 nmol/ml, natomiast w surowicach uzyskanych od zwierząt bezpośrednio po transporcie wartość ta była równa 29,457±4,626 nmol/ml, a u ptaków w 2. dni po transporcie wynosiła 5,748±2,456 nmol/ml (tab. 2).

Tabela 2. Średnie stężenie kortyzolu w nmol/l (OD ± SD) w surowicach pochodzących od 30-dniowych brojlerów kurzych

Table 2. The mean cortisol concentration in nmol/l (OD ± SD) in serum obtained from 30 day-old broilers

Nr brojlera No. of broiler	Przed transportem Before transport	Bezpośrednio po transporcie Immediately after transport	2 dzień po transporcie 2 days after transport
1.	7,530	29,413	4,374
2.	4,580	33,098	9,342
3.	2,258	26,915	4,232
4.	5,201	23,216	3,558
5.	5,088	34,644	7,236
OD±SD	4,931±1,879	29,457 [*] ±4,626	5,748 ^{**} ±2,456

*Różnice istotne statystycznie z (p<0,05) w porównaniu z grupą przed transportem

Significant differences at p<0.05 compared to group before transport

**Różnice istotne statystycznie z (p<0,05) w porównaniu z grupą po transporcie

Significant differences at p<0.05 compared to group immediately after transport

Uzyskane rezultaty są zgodne z wynikami przedstawionymi przez Mohameda i Hansona [1980], którzy potwierdzili, że niedojrzałe kurczęta poddane stresowi miały podwyższony poziom kortyzolu w surowicach przez pierwsze 24 godziny po zadziałaniu stresu.

W badaniach innych autorów u kurcząt po iniekcji ACTH (adrenokortykotropiny) i deksametazonu stwierdzono nawet 16-krotny wzrost stężenia kortyzolu w surowicy (wartości od 19 do 38 ng/ml), a następnie spadek po 4 godzinach od stymulacji do wartości oznaczonych przed doświadczeniem (1,1–2,5 ng/ml) [Dehnhard i in. 2003]. Z kolei u papug Amazonek po stymulacji ACTH stwierdzono wzrost stężenia kortyzolu od wartości 0,160 do 0,266 µg/dl [Zenoble i in. 1985].

Otrzymany w badaniach własnych istotny wzrost wartości kortyzolu w surowicach przewożonych brojlerów kurzych świadczy o przebiegu reakcji stresowej wywołanej czynnikami związanymi z transportem.

Hormony sterydowe u ptaków mają wpływ na gospodarkę lipidową (tj. odkładanie tłuszczu) i cukrową (wzmagają glukoneogenezę). Ponadto wywierają wpływ na gospodarkę elektrolitową. Katabolizm sterydów przebiega głównie w wątrobie. Szlak metaboliczny jest odmienny dla różnych hormonów. Kortyzol ulega równoczesnej redukcji i oksydacji, dając czterohydroksypochodne: kortol i kortolon. Pojawiają się one w postaci koniugatów z kwasem siarkowym lub glukuronowym we krwi i nie wykazują aktywności biologicznej. Kortyzol w ustroju jest w stanie dynamicznej równowagi ze swoją utlenioną formą kortyzonem, podobnie jak i kortykosteron ze swoją odwodorowaną pochodną dehydrokortykosteronem.

Istotny wpływ glikokortykosterydów na podstawowe parametry immunologiczne organizmu obserwowano u wielu gatunków zwierząt [Hawkey 1989, Renden i in. 1994]. Jednak zróżnicowanie wyników badań uzyskiwanych w ośrodkach naukowych może być rezultatem zmian czasu trwania i warunków transportu oraz wieku przewożonych zwierząt.

Brak kompleksowych badań na temat wpływu stresu na poszczególne etapy odpowiedzi immunologicznej oraz układ hormonalny nie pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że uzyskane w badaniach własnych zmiany parametrów mogą wynikać z jej supresji. Zróżnicowanie wyników badań własnych w porównaniu z rezultatami innych autorów świadczy o złożonym mechanizmie oddziaływania stresu transportowego na organizm ptaków.

PIŚMIENNICTWO

- al-Murrani W.K., Kassab A., al-Sam H.Z., al-Athari A.M. 1997. Heterophil/lymphocyte ratio as a selection criterion for heat resistance in domestic fowls. *Br. Poult. Sci.* 38, 159.
- Collette J.C., Millam J.R., Klasing K.C. Wakenell P.C. 2000. Neonatal handling of Amazon parrots alters the stress response and immune function. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 66, 335.
- De Jong I. C., Sander van Voorst A., Erkens Jo, H. F., Ehlhardt D.A., Blokhuis H. J. 2001. Determination of the circadian rhythm in plasma corticosterone and catecholamine concentrations in growing broiler breeders using intravenous cannulation. *Physiol. Behav.* 74, 299.
- Dehnhard M., Schreer A., Krone O., Jewgenow K., Krause M., Grossmann R. 2003. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 131, 345.
- El-Iethy H., Jungi T. W., Huber-Eicher B. 2001. Effects of feeding corticosterone and housing conditions on feather pecking in laying hens (*Gallus gallus domesticus*). *Physiol. Behav.* 73, 243.
- Graczyk S., Pliszczyk-Król A., Kotoński B., Wilczek J., Chmielak Z. 2003. Examinations of hematological and metabolic changes mechanisms of acute stress in turkeys. *EJPAU, Vet. Med.* 6, 1.
- Gross W.B., Siegel H.S. 1983. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Dis.* 27, 972.
- Hawkey C.M. 1989. Color atlas of comparative veterinary hematology: normal and abnormal blood cells in mammals, birds and reptiles, 1st ed., Iowa State University Press, Ames.
- McFarlane J.M., Curtis S.E. 1989. Multiple concurrent stressors in chicks. 3. Effects on plasma corticosterone and the heterophil: lymphocyte ratio. *Poult. Sci.* 64, 522.
- Mills A.D., Jones R.B., Williams J.B. 1993. Responses to isolation in Japanese quail genetically selected for high or low sociality. *Physiol. Behav.* 53, 183.
- Mohamed M. A., Hanson R. P. 1980. Effect of social stress on Newcastle Disease virus (LaSota) infection. *Avian Dis.* 24, 908.
- Möstl E., Messmann S., Bagu E., Robia C., Palme R. 1999. Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. *J. Vet. Med. A* 46, 621.
- Palme R., Robia Ch., Messmann S., Hofer J., Möstl E. 1999. Measurement faecal cortisol metabolites in ruminants: a non-invasive parameter of adrenocortical function. *Wien. Tierarztl. Mschr.* 86, 237.
- Puvadolpirod S., Thaxton J. P. 2000. Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. *Poult. Sci.* 79, 363.
- Renden J.A., Lien R.J., Oates S.S., Bilgili S.F. 1994. Plasma concentrations of corticosterone and thyroid hormones in broilers provided various lighting schedules. *Poult. Sci.* 73, 186.
- Zenobe R.D., Kemppainen R.J., Young D.W., Clubb S.L. 1985: Endocrine responses of healthy parrots to ACTH and thyroid stimulating hormone. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187, 1116.

SUMMARY

In intensive breeding of animals, especially poultry is significantly conducive to stressful situations. The fact is commonly known of unfavorable influence of stress factor on the bird organism, which leads to the increase of illnesses, as a result of immunological response dysfunction. Consequently even weak pathogenic microorganisms may add to the appearance of an infection and clinical disease development.

The aim of the conducted research was defining the transport stress impact on chicken broilers. The research was conducted on two groups of birds Ross 308 breed, aged 14 and 30 days old composed of 5 heads each, which were transported at 180 km distance during two hours. The birds were clinically healthy, free of parasites and free of *Salmonella* spp. infection at the beginning of the experiment. They were housed in separate cages during the transportation. The blood smears and samples from the wing vein had been taken before the transportation, directly after and two days later. In order to specify the stress intensity the proportion of heterophils to lymphocytes (H/L) was counted according to Collette *at al.* [2000] method, which is the basic indicator of bird stress. In the serum samples the total protein level was noted with the use of biuret reaction with the wavelength of 546 nm. Additionally, in the examined samples the cortisol levels (ELISA) were estimated.

The analysis of the t-Student results showed a statistically significant increase at both: birds aged 14 as well as 30 days old ($p < 0.05$) in proportion of heterophils to lymphocytes immediately after transport and decreased 2 days after transport. What is more, the increase of total protein level in both broiler groups was revealed. It was particularly observed 2 days after the transport. In both examined groups of birds the transport stress significantly influenced the cortisol level, which increased directly immediately after transport and decreased 2 days after transport.

Key words: transport stress, chicken, H/L ratio, cortisol concentration, total protein level