



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

Comparazione tra metodiche diagnostiche e
monitoraggio di alcuni parametri ematici nei
diversi stadi dell'acidosi ruminale bovina

Relatore
Dott. Giancesella Matteo
Correlatore
Dott. Marchesini Giorgio

Laureanda
Margherita Lanza
Matricola n.
601040/MV

ANNO ACCADEMICO

2013-2014

*Perchè questo è
il lavoro
più bello del mondo!*

INDICE

ABSTRACT	7
INTRODUZIONE	9
ACIDOSI RUMINALE	9
1- DEFINIZIONE E TERMINOLOGIA	10
2- EPIDEMIOLOGIA ED IMPATTO ECONOMICO	11
2.1- Prevalenza della SARA	12
2.2- Incidenza della SARA	12
3- EZIOLOGIA E FATTORI PREDISPONENTI	13
4- PATOGENESI	16
5- SEGNI E SINTOMI	18
5.1- Diarrea	19
5.2- Laminite	20
5.3- Acidosi metabolica	21
5.4- Ipomotilità ruminale, meteorismo e altre alterazioni ruminali	22
5.5- Scadimento delle condizioni corporee	22
5.6- Variazioni della qualità del latte	23
5.7- Problemi riproduttivi	24
5.8- Altre patologie	24
6- DIAGNOSI	26
6.1- Anamnesi e valutazione clinica della mandria	26
6.2- Analisi dell'alimento	27
6.3- Valutazione del pH ruminale	28
6.4- Valutazione dei parametri ematici	30
7- PREVENZIONE E TERAPIA	31
SCOPO	36
MATERIALI E METODI	37
ANIMALI E CONDIZIONI DI STABULAZIONE	37
DISEGNO SPERIMENTALE E DIETE	37
PROTOCOLLO DI INDUZIONE DELL'ACIDOSI RUMINALE	38
RILIEVI ED ANALISI	38
1- BODY CONDITION SCORE (BCS)	38
2- INGESTIONE	38
3- VALUTAZIONE DEL PH RUMINALE	39
a. Tramite l'utilizzo di boli	39
b. Tramite ruminocentesi	41
4- PRELIEVI EMATICI	43
4.1- Analisi dei parametri ematici	43

5- ANALISI STATISTICA	44
RISULTATI E DISCUSSIONE	45
CONCLUSIONI	54
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	55

ABSTRACT

Sub-Acute Ruminal Acidosis (SARA) is a digestive disorder often affecting high producing cows in early lactation that is characterized by abnormal rumen fermentations due to an excessive starch supply and a low content of roughage in diet. SARA usually occurs during the transition period, when the ration composition shifts from a low energy high fiber content in dry period to a high energy grain-based lactation diet.

As SARA is related to great economic losses, a great importance is given to those studies whose purpose is to establish an easy method for reaching a sensitive, accurate and early field diagnosis. The aims of this study were to compare the measures of ruminal pH obtained by using an indwelling pH measuring device and rumenocentesis, and verify if some blood parameters could be effective in the diagnosis of different levels of ruminal acidosis

Six heifers, provided with a ruminal bolus, were submitted to three challenge protocols, in a 3 x 3 Latin Square design, to induce acute ruminal acidosis (HS), subacute ruminal acidosis (MS) and to maintain the physiological ruminal acidity (CT). The animals were repeatedly tested by taking blood samples twice a day and rumen fluid samples once for each experimental period. Individual DMI (Dry Matter Intake) was monitored daily. Data have been analyzed by using a PROC MIXED (when normally distributed) or a Kruskal-Wallis test (SAS 2008, vers. 9.2). The regression coefficient between ruminal pH measured by using bolus and rumenocentesis was 0,56 ($P = 0,040$), and this means that these two methods are statistically comparable.

Animals fed different treatments showed different DMI (7,7 vs. 6,9 vs. 5,1 kg/d; $P = 0,002$), nadir pH (5,44 vs. 5,47 vs. 5,69; $P = 0,042$) and mean pH (6,31 vs. 6,34 vs. 6,50; $P = 0,012$), for CT, MS and HS respectively.

It has been recognized even a relationship between blood parameters such as HGB, HCT, PLT, HCO_3^- , and LBP, and treatment.

Feeding the CT, MS and HS led to differences in the haemoglobin level (11,1 vs.

10,9 vs. 11,4 g/dL; $P = 0.010$), platelet count (506 vs. 481 vs. 601; $P = 0.008$), HCO_3^- (31,8 vs. 31,3 vs. 30,6 mmol/L; $P = 0.071$) and LBP (5,9 vs. 9,5 vs. 10,5 $\mu\text{g/mL}$; $P < 0.001$).

These differences between control and the other treatments are due to concentration of blood, the onset of damages on rumen mucosa, the reduction of blood buffers, and the increased acute phase protein response.

Even if more studies are required, both for the indwelling devices efficiency, and for the determination of more specific blood variables, this field study reported that these blood parameters may be quite effective indicators of rumen fermentative disorders.

INTRODUZIONE

ACIDOSI RUMINALE SUBACUTA

L'acidosi ruminale subacuta (SARA, dall'inglese Sub-Acute Ruminal Acidosis) è un disturbo fermentativo-metabolico spesso riscontrato negli allevamenti di bovine da latte, soprattutto se grandi produttrici, a prescindere dalla qualità del management degli animali (Enemark, 2008).

Si tratta di una condizione patologica la cui eziologia è multifattoriale, in quanto è favorita da una errata gestione (preparazione e somministrazione) della dieta, da una condizione dell'animale non adeguata, dalla gestione dell'animale nel gruppo, dalla stagione etc. Identificare una causa predominante è difficile, anche se generalmente si attribuisce la maggiore responsabilità alla composizione della dieta e alla sua modalità di somministrazione agli animali. La somministrazione di diete ad alto contenuto di concentrati, formulata per sopperire alle carenze nutrizionali che caratterizzano il primo postpartum, porta ad uno squilibrio tra la produzione di Acidi Grassi Volatili (VFA, dall'inglese Volatile Fatty Acids) e acido lattico, e la rimozione degli stessi, o l'attività di tamponamento della loro acidità, causando un circolo vizioso in cui l'acidità riduce le suddette funzioni peggiorando la condizione all'interno del rumine (Dijkstra *et al.*, 2012).

La SARA non ha una propria manifestazione clinica ben definita, ed i sintomi ad essa attribuiti in genere non sono eclatanti, né specifici, e generalmente hanno decorso subdolo e insorgenza ritardata rispetto all'insorgenza dello stato acidotico. In letteratura si trovano fonti che assumono la responsabilità della SARA nello sviluppo di condizioni come la laminite (Nocek, 1997), o il calo della percentuale di grasso nel latte (Oetzel, 2000), o il calo delle condizioni corporee (BCS, dall'inglese Body Condition Score), senza però che ci siano prove dell'effettiva correlazione tra l'acidosi ruminale e queste manifestazioni cliniche (Kleen and Cannizzo, 2012).

1- DEFINIZIONE E TERMINOLOGIA

La definizione, in termini di pH, della SARA è stata ampiamente dibattuta, ma ad oggi non si è ancora raggiunto un consenso unanime sui limiti di valori da imporre per diagnosticarla: si concorda sul calo del pH che la caratterizza, che passa dal valore fisiologico di 6,0 – 6,8 a pH inferiori, ma i valori soglia riscontrabili in letteratura sono vari, compresi tra 5,5 e 6,0. Le soglie più frequentemente utilizzate sono quelle enunciate da Garrett (Garrett *et al.*, 1999), che indica un pH di 5,8 come soglia sotto la quale gli animali sono ritenuti in stato di acidosi subacuta per accumulo non compensato di VFA all'interno del rumine, con valori inferiori a 5,5 per almeno 1 ora al giorno (anche se, in uno studio eseguito su 16 bovine clinicamente sane, gravide, in seconda o terza lattazione, è stato dimostrato che c'è una notevole variabilità nella durata del picco negativo: da 0 a 6 ore, con deviazione standard di almeno 2 ore) (Duffield *et al.*, 2004). Garrett inoltre dimostra che il valore scelto come soglia, 5,5, è stato selezionato su basi meramente statistiche, e non fisiologiche (Garrett *et al.*, 1999).

La SARA va distinta dall'Acidosi Ruminale Acuta, detta anche acidosi lattica o D-lattica, evento patologico accidentale in cui acidità e osmolalità del contenuto del rumine aumentano improvvisamente, generalmente quando l'animale assume grandi quantità di concentrati (prevalentemente granaglie) a cui normalmente non avrebbe libero accesso: il soggetto va incontro a sovraccrescita batterica e iperproduzione non compensata di acido lattico, soprattutto D-lattico, e glucosio a livello ruminale, acidosi metabolica, anoressia, diminuita produzione latte, diarrea, e quindi disidratazione, depressione, tossiemia, ruminite iperacuta e addome acuto. Ha decorso rapido e talvolta fatale in meno di 24 ore (Annison *et al.*, 2007).

La SARA va inoltre distinta anche dall'Acidosi Ruminale Cronica, frequentemente riscontrata nei soggetti da carne, in cui il valore del pH ruminale si aggira costantemente tra 5,0 e 5,5 per l'elevato contenuto di concentrati nella dieta. Essendo una forma cronica, però, l'organismo riesce ad adattarsi a questo stato che diventa quasi para-fisiologico, con una modificazione della flora microbica ruminale a favore di microrganismi lattico-utilizzatori, e il soggetto non subisce danni acuti ma un lieve calo delle performance produttive e una moderata acidosi metabolica.

2- EPIDEMIOLOGIA ED IMPATTO ECONOMICO

La sintomatologia normalmente attribuita alla SARA non è immediatamente ricollegabile alla condizione acidotica, essendo molto aspecifica, subdola e spesso ritardata; contemporaneamente, si associano alla SARA uno scadimento delle condizioni corporee e delle produzioni dei soggetti colpiti, con conseguente aumento del tasso di rimonta, il che porta alla necessità di prestare attenzione alla problematica. Quindi, non essendo sufficiente la valutazione delle condizioni e delle abitudini della mandria a fini diagnostici, è fondamentale individuare una metodica rapida, poco invasiva ed economica per rilevare le condizioni del ruminante in campo. Purtroppo, un parametro di facile accesso quale il pH fecale, che si riteneva potesse avere una rilevanza diagnostica vista la contiguità della fonte con la sede del processo, ha dimostrato di essere inutilizzabile ai fini diagnostici (Enemark, 2008). Neppure la percentuale di grasso nel latte, il cui calo si riteneva essere un buon indicatore della condizione acidotica, è utilizzabile ai fini diagnostici, in quanto non è stato possibile evidenziare alcuna prova dell'effettiva correlazione tra i due eventi (Kleen and Cannizzo, 2012). Allo stato attuale, quindi, l'unico parametro utilizzato a scopo diagnostico è il liquido ruminale, prelevato tramite ruminocentesi: la valutazione diretta del suo pH infatti permette di indicare il rischio del singolo individuo di sviluppare SARA (Garrett *et al.*, 1999). La ruminocentesi, ossia il prelievo, tramite puntura addominale, della fase liquida del contenuto ruminale a livello del sacco ventrale, è una metodica sicura e ben tollerata dai soggetti, in cui scarsamente si riscontrano effetti negativi (Kleen *et al.*, 2004) come ascessi intraparietali nella parete del ruminante, la cui incidenza è comunque riducibile dalla messa in opera delle migliori pratiche asettiche possibili in campo).

Il limite di questa metodica è che fornisce solo un'istantanea sulla situazione, senza poter avere un'idea sull'andamento del pH nel corso del tempo, e quindi il risultato è influenzabile, per esempio, dalla distanza del prelievo dal momento della somministrazione dell'alimento agli animali. A questo scopo si stanno studiando dei sistemi di rilevazione in continuo del pH a livello rumino-reticolare (boli endoruminali), in modo da poter mantenere un maggiore controllo della salute del ruminante (Sato, Ikeda, *et al.*, 2012; Sato, Mizuguchi, *et al.*, 2012).

2.1 - Prevalenza della SARA

Col termine “prevalenza” si indica la percentuale di animali che, all'interno della mandria o di un gruppo, presenta la SARA in un qualsiasi momento. A parte i numerosi studi sperimentali, le ricerche volte a identificare globalmente la prevalenza di SARA scarseggiano, anche a causa della difficoltà e non univocità della sua valutazione. Gli studi sono vari, e le percentuali cambiano molto da studio a studio. In Irlanda, una prova attestava una prevalenza dell'11% di SARA in vacche al pascolo (O'Grady, Doherty, and Mulligan, 2008); in Italia, la prevalenza si aggira attorno al 33%, sia per quanto riguarda le stalle in cui è presente la SARA, sia per quanto riguarda gli animali nelle singole aziende (Gianesella, 2013; Morgante *et al.*, 2007); nei Paesi Bassi, la percentuale di vacche con acidosi è del 13,8% in 18 aziende (Kleen *et al.*, 2004).

Allo stesso modo, nonostante siano stati individuati periodi a rischio (Kleen *et al.*, 2003), e pare che ci sia una maggior predisposizione a sviluppare acidosi ruminale nelle primipare rispetto alle pluripare (Krause and Oetzel, 2006), altri studi non hanno più riscontrato l'influenza della fase di lattazione sulla prevalenza della SARA.

La variabilità delle condizioni di allevamento e delle fasi di lattazione dimostra che valori di pH riconducibili alla SARA possono essere riscontrati in ogni tipo di allevamento e in ogni momento della lattazione, e che in aziende gestite in maniere simili possono esserci comunque grandi differenze (Kleen and Cannizzo, 2012).

2.2 - Incidenza della SARA

L'“incidenza” indica il numero di animali che svilupperanno la SARA entro un dato intervallo di tempo, ad esempio un giorno. Per stabilire questo parametro sarebbe necessaria la valutazione in continuo citata precedentemente, o una misurazione a intervalli stabiliti. Sempre per la difficile diagnosi, questo tipo di indicazione è ottenibile solo da studi sperimentali, e che quindi coinvolgono un numero limitato di individui, rendendo impossibile una valutazione a livello di popolazione.

Quello che è possibile dimostrare, comunque, è che un buon management aziendale, con una riduzione di tutti quei fattori concomitanti che contribuiscono allo sviluppo di uno stato di SARA, e il mantenimento di una percentuale di peNDF

(physically effective NDF, ossia la fibra che garantisce un effetto su masticazione e ruminazione) pari a circa un terzo della sostanza secca ingerita, concorrono alla riduzione dell'incidenza di SARA. Queste considerazioni saranno meglio sviluppate nel prossimo paragrafo.

Per terminare questo discorso, invece, è da rilevare l'importanza economica dello stato acidotico: data la difficoltà di rilevazione, solitamente si diagnostica la SARA quando la situazione in allevamento è abbastanza critica, ossia quando la sintomatologia e le perdite economiche che ne conseguono si sono già stabilizzate. Studi ormai non recentissimi attestavano una perdita economica di più di un dollaro al giorno per singolo capo con SARA (Stone, 1999), e relativamente alla sola riduzione della produzione latte, senza contare quindi le altre patologie associate, quali ad esempio le laminiti, il cui reale impatto economico è ancora più complicato da calcolare. Inoltre, lo stato acidotico riduce le performance riproduttive ed immunitarie, aumentando notevolmente le cause che spingono gli allevatori a ricorrere inevitabilmente ad una rimonta precoce (Krause and Oetzel, 2006).

3- EZIOLOGIA E FATTORI PREDISPONENTI

La SARA è una patologia ad eziologia multifattoriale, ossia sono numerosissime le condizioni che possono concorrere nel suo sviluppo. Prima fra tutti, la gestione alimentare delle bovine.

In uno studio condotto da Kleen (Kleen *et al.*, 2003) si può notare come siano le bovine ad inizio lattazione ad essere maggiormente suscettibili a squilibri nel pH e nella flora ruminale. Questa suscettibilità è spiegata ampiamente nella difficoltà della bovina nella fase cosiddetta “di transizione” – identificata convenzionalmente nel periodo che va da tre settimane prima del parto a tre settimane dopo il parto – ad adattarsi alle modificazioni fisiologiche, alimentari e gestionali, ossia il passaggio dalla fase di asciutta, in cui la bovina è gravida, alla fase di inizio lattazione, in cui non è ancora iniziata la gravidanza successiva.

L'asciutta, comunemente considerato un momento di “riposo” per la lattifera, e caratterizzato da un'alimentazione prevalentemente fibrosa, è in realtà un momento metabolicamente molto impegnativo, per la bovina: il tessuto ghiandolare della

mammella si sta rigenerando e approntando per la successiva lattazione, e il feto sta rapidamente terminando la crescita, richiedendo apporti energetici notevoli cui la vacca, data la capacità di ingestione limitata dall'ingombro causato dall'utero gravido e la dieta scarsamente energetica, deve sopperire mobilizzando le riserve corporee. In queste condizioni, la bovina va necessariamente incontro ad un momento di bilancio energetico negativo (NEB, dall'inglese Negative Energy Balance) (Kim and Suh, 2003).

Una volta sostenuto lo sforzo del parto, cambiano improvvisamente le richieste energetiche in favore dei nutrienti precursori dei componenti del latte, ma il metabolismo e la capacità di ingestione e digestione della bovina non sono ancora ristabilite; a questo si aggiunge lo stress legato al cambiamento nel management del soggetto, generalmente mantenuto in un gruppo separato di animali asciutti e poi re-inserito nel gruppo delle bovine in lattazione. Per fronteggiare questo stress metabolico, la fisiologia della bovina cambia, ed aumentano l'insulinoresistenza dei tessuti adiposo e muscolare e la sensibilità a fattori lipolitici, con l'obiettivo di mantenere all'interno del circolo sanguigno la quantità di nutrienti necessari alla produzione latte (Esposito *et al.*, 2014).

Da parte dell'allevatore, questo cambiamento è fronteggiato somministrando alle vacche in lattazione una razione più ricca in concentrati, cioè in energia: il passaggio brusco dalla dieta prevalentemente fibrosa tipica dell'asciutta, a quella altamente energetica somministrata in lattazione, causa un cambiamento dell'ambiente ruminale, che non è ancora adattato agli apporti di sostanze fermentescibili. In asciutta, infatti, le papille presenti sulla mucosa ruminale sono piccole e non adatte ad assorbire grandi quantità di VFA, e l'adattamento richiede dalle tre alle quattro settimane (Goff and Horst, 1997).

La concomitanza, durante il periodo di transizione, di uno stress metabolico, di una risposta endocrina allo scopo di ridurlo e di un calo immunitario che consegue all'inefficienza metabolica portano all'incapacità di affrontare il cambiamento della dieta e della propria fisiologia senza andare incontro ad alterazioni metaboliche patologiche tipiche di questa fase, come la chetosi clinica e subclinica, la sindrome del fegato grasso (Fatty Liver Syndrome) e l'acidosi ruminale acuta e subacuta; ad alterazioni patologiche nell'utilizzo dei minerali, quali l'ipocalcemia subclinica e il

collasso puerperale (Milk Fever); alla riduzione della risposta immunitaria, che può sfociare in ritenzioni di placenta, metriti e mastiti (Esposito *et al.*, 2014).

La base da cui parte la condizione acidotica è un sovraccarico ruminale, indotto da uno squilibrio tra il quantitativo di fibra e il quantitativo di concentrati somministrati con la razione. Abbiamo detto che l'acidosi ruminale acuta è conseguente all'ingestione da parte di un soggetto di una quantità di concentrati a cui non avrebbe normalmente accesso: è quindi un fenomeno isolato, individuale, e accidentale. La SARA, invece, si caratterizza come problematica di mandria, o di gruppo, ed è strettamente correlata ad errori nella formulazione, preparazione o somministrazione della razione alle bovine.

Per cercare di ridurre il NEB, infatti, gli allevatori aumentano la percentuale di amidi e altri substrati energetici, andando a modificare l'equilibrio tra concentrati e fibre, che dovrebbe essere mantenuto ad una costante di circa 300-330 g di peNDF/kg DM (sostanza secca, dall'inglese Dry Matter) (Dijkstra *et al.*, 2012; Kleen and Cannizzo, 2012; Zebeli *et al.*, 2010): Dijkstra afferma che questa proporzione mantiene il pH ruminale ad un valore di 6,27, e va lievemente aggiustata in base alla degradabilità dell'amido somministrato e alla quantità di alimento assunto (DMI, dall'inglese Dry Matter Intake). Possibilmente, il 75% della fibra contenuta in diete TMR (Total Mixed Ratio, comunemente chiamate “Unifeed”) dovrebbe provenire da foraggi; una percentuale più alta per le diete a componenti separate, che permettono una maggiore selezione dell'alimento da parte delle bovine.

Per peNDF si intende la fibra strutturale che effettivamente ha attività sulla ruminazione, sulla stratificazione dell'alimento a livello ruminale, sulla salivazione etc.: è importante, quindi, non solo la percentuale analitica di NDF contenuto nella razione, ma anche la lunghezza delle particelle, in quanto è stato dimostrato che particelle inferiori a 1,18 mm non sono trattenute nel rumine e quindi non stimolano la masticazione (Morgante *et al.*, 2007). La sola considerazione della peNDF, però, è limitante, in quanto non tiene conto delle caratteristiche dei substrati fermentescibili (Dijkstra *et al.*, 2012).

Inoltre, il NEB induce l'animale a selezionare quei componenti della razione che forniscano un quantitativo maggiore di energia in poco spazio (il rumine, nel primo

post parto, deve ancora riprendere le dimensioni normali), e quindi proprio quegli alimenti che possono aumentare il rischio di acidosi. Questo tipo di selezione può essere stimolata anche da un fronte mangiatoia non proporzionato alle dimensioni della mandria, ad una frequenza di somministrazione della razione ridotta (una volta, piuttosto che due o più durante la giornata) o ad una condizione di stress sociale dato da scontri gerarchici in gruppi troppo numerosi: le bovine che arrivano alla mangiatoia per prime tendono ad ingerire quello che può fornire loro l'energia che necessitano nel minor tempo possibile, selezionando i concentrati ed evitando i foraggi. Chiaramente, la selezione dei singoli componenti è possibile qualora la razione non sia adeguatamente miscelata, sia troppo asciutta o abbia un grado di trinciatura insufficiente (Kleen and Cannizzo, 2012; Enemark, 2008; Morgante *et al.*, 2007).

4- PATOGENESI

La SARA, quindi, è sicuramente indotta da una eccessiva fermentescibilità dell'alimento somministrato – o meglio, ingerito – dalle bovine, soprattutto in corso di NEB.

Nella fase di transizione, a livello ruminale predominano i batteri cellulolitici: questo shift della popolazione microbica verso una flora prevalentemente cellulolitica avviene in asciutta, per il tipo di dieta che viene somministrata alle bovine. Col passaggio dalla alimentazione da asciutta a quella da lattazione, la percentuale di carboidrati non strutturali (NFC, dall'inglese Not-Fiber Carbohydrates) viene aumentata a discapito della fibra, ma la flora microbica preposta alla digestione e soprattutto all'utilizzo degli amidi non è sufficientemente sviluppata: ne consegue che i VFA e l'acido lattico prodotti si accumulano all'interno del rumine, causando una riduzione del pH, e quindi acidosi ruminale (Kleen and Cannizzo, 2012; Gianesella *et al.*, 2010; Penner, Beauchemin and Mutsvangwa, 2006)

Osservando più nel dettaglio il meccanismo patogenetico della SARA, le fermentazioni batteriche che utilizzano come substrato gli amidi portano normalmente alla produzione di VFA e piccole quantità di acido lattico. Ad un pH inferiore a 6, le fermentazioni portano ad una maggiore produzione di acido

propionico, rispetto ad acido acetico e butirrico (maggiore substrato utilizzato dall'epitelio ruminale, ha anche un'azione mitotica per aumentare la rimozione degli acidi attraverso la parete ruminale); la produzione di acido lattico rimane bassa, ma sotto il valore di 5,7 la velocità di produzione supera quella di rimozione, quindi questo accumula (Dijkstra *et al.*, 2012).

Le papille presenti sulla mucosa del rumine, o meglio, l'epitelio che le costituisce, hanno la funzione di assorbire e tamponare questi composti, in modo da ristabilire il pH fisiologico. L'assorbimento dei VFA avviene secondo tre meccanismi: (1) assorbimento dei VFA indissociati per diffusione passiva lipofila; (2) assorbimento di VFA dissociati bicarbonato-dipendente e (3) assorbimento di VFA dissociati bicarbonato-indipendente. La prima via dipende dalla lunghezza delle catene che costituiscono i VFA (l'assorbimento è butirrico (C4) > propionico (C3) > acetico (C2)) e dal pH (a pH inferiori, una maggior quantità di VFA si presenterà in forma indissociata, secondo l'equilibrio di Henderson-Hasselbach), e contribuisce direttamente alla stabilizzazione del pH ruminale perché comporta l'assorbimento contemporaneo di un anione e un protone. L'assorbimento dei VFA dissociati (VFA⁻) richiede la presenza di proteine carrier e il dispendio di energia; per mantenere il potenziale elettrico tra l'interno e l'esterno delle cellule, perché queste non si lisino per alterazione dell'osmolarità al loro interno, ad ogni uptake di un VFA⁻ è necessario che venga secreto un altro anione, o che venga assorbito un catione: ecco che lo scambio VFA/bicarbonato risulta fondamentale per mantenere il pH vicino alla neutralità. Il terzo meccanismo, l'assorbimento bicarbonato-indipendente di VFA dissociati, è sostenuto da una proteina di trasporto, ma ha un effetto negativo sul pH ruminale, in quanto rimuove una base debole (VFA⁻) lasciando un protone all'interno del rumine (Dijkstra *et al.*, 2012).

Oltre alla rimozione degli acidi, fondamentale per il controllo del pH ruminale è l'attività di “*buffering*”, che sfrutta la capacità di alcune sostanze, primo fra tutti il bicarbonato, di tamponare l'acidità intraruminale. Il bicarbonato è il tampone principale che agisce a livello ruminale. Esso deriva prevalentemente dalla saliva, che nei bovini ha solitamente un pH di 8,0 e la cui produzione è stimolata dall'assunzione di alimento (ossia, DMI) e dalla quantità di fibra in esso contenuta: il ruolo della fibra però non è completamente chiaro, in quanto un aumento della peNDF porta ad un aumento di masticazione e ruminazione, e quindi di salivazione,

rispetto ai livelli indotti dai concentrati, ma causa una riduzione della produzione di saliva nelle fasi di riposo, risultando quindi in nessun cambiamento nel quantitativo totale di saliva prodotta (Maekawa, Beauchemin, and Christensen, 2002).

Oltre al bicarbonato proveniente dalla saliva, nel ruminale agisce il bicarbonato proveniente dallo scambio sopracitato, con la stessa efficacia nel controllo del pH.

Ultimo, ma non meno importante, meccanismo di controllo dell'acidità intraruminale è la capacità di scambio di cationi degli alimenti, definita come *Buffer Capacity* (BC) e che riguarda la concentrazione di gruppi carichi (proteine e lignine) che scambiano cationi per protoni: aumentando le proteine e la maturità dei foraggi utilizzati si può aumentare la BC della razione. Il contenuto di ceneri dell'alimento può essere utilizzato come indicatore della BC dello stesso (Dijkstra *et al.*, 2012).

Quando questi sistemi di regolazione del pH si esauriscono, o vengono sovraccaricati, il pH del contenuto ruminale scende, causando una riduzione della popolazione, o solo dell'attività, dei batteri fibrolitici, facilitando quelli amilolitici: questo comporta una riduzione della degradazione dei nutrienti che, associata all'azione anoressizzante del lattato e delle fluttuazioni dell'osmolalità del contenuto ruminale che causano un calo di DMI, porta l'animale ad assumere, come ricordato prima, preferibilmente quegli alimenti che possono rilasciare maggior quantitativi di energia in meno tempo. Si instaura quindi un circolo vizioso, tra appetito capriccioso, insulinoresistenza (che si viene a creare a livello di muscolo e tessuto adiposo), e mal digestione degli alimenti, che ha come conseguenze lo scadimento delle condizioni corporee, immunologiche e produttive del soggetto (Esposito *et al.*, 2014; Kleen and Cannizzo, 2012; Enemark, 2008; Plaizier *et al.*, 2008).

5- SEGNI E SINTOMI

La SARA non ha una sintomatologia definibile come propria: questo stato patologico è associato a segni e sintomi moderati, aspecifici e spesso temporalmente lontani, che possono essere associati sia alla SARA, sia alle condizioni metaboliche, immunologiche ed endocrine che la bovina deve affrontare nel periodo di transizione. Non ci sono prove, infatti, che la laminite, il calo del

contenuto di grasso nel latte, o la suscettibilità a chetosi e meteorismo siano da ricondurre all'insulto acido della SARA (Kleen and Cannizzo, 2012).

Uno dei meccanismi per cui la SARA potrebbe essere implicata nella patogenesi di altre patologie è il rilascio di lipopolisaccaridi (LPS) che segue la morte cellulare dei batteri (Gram-) che non riescono ad affrontare il pH acido. Il LPS è un componente della parete cellulare di batteri Gram- che agisce come barriera alla permeabilità della stessa; viene prodotto durante la duplicazione e le fasi stazionarie della crescita batterica, e liberato in caso di disintegrazione e lisi cellulare. La quantità di LPS rilasciato varia tra le diverse specie ed i diversi ceppi di batteri. La forma libera nell'ospite è comunemente chiamata “endotossina”. Il LPS interagisce con le cellule del sistema immunitario inducendole a produrre e rilasciare mediatori pro-infiammatori, le “citochine”, che stimolano a loro volta una risposta immunitaria di fase acuta, caratterizzata da proteine particolari, le proteine di fase acuta (APPs, dall'inglese Acute Phase Proteins): citochine e chemochine (altri mediatori dell'infiammazione) inducono uno stato infiammatorio generalizzato, agendo a tutti i livelli dell'organismo (Plaizier *et al.*, 2012).

Un'altra conseguenza della SARA con ripercussioni generalizzate è il rilascio di istamina in seguito al danno cellulare subito dalla mucosa del rumine. Di seguito sono indicati i segni e sintomi che comunemente sono associati alla SARA.

5.1- Diarrea

In corso di SARA, l'acido lattico che supera i prestomaci e raggiunge l'intestino ha effetto osmotico ed irritativo sulla mucosa intestinale, richiamando liquidi nel lume dell'intestino, e causando quindi diarrea e disidratazione (Annison *et al.*, 2007). Le feci dei soggetti in acidosi sono liquide, chiare o giallastre, con residui di fibra e soprattutto di cereali mal digeriti, presentano bolle di gas e un odore acre-dolciastro (Kleen *et al.*, 2003) invece dell'odore tipicamente erbaceo delle feci degli animali allevati al pascolo, e, a volte, presentano frammenti di mucina. Osservare un aumento del livello di imbrattamento di perineo, coda, mammella e arti posteriori degli animali in azienda, in assenza di altre patologie gastroenteriche (ad esempio paratubercolosi), e ravvisare una riduzione della consistenza delle feci nella mandria, soprattutto quando si ha a che fare con animali molto produttivi e quindi con un'alimentazione piuttosto energetica, deve sempre destare una certa attenzione,

dato che può indicare uno stato di alterazione dell'equilibrio nella flora e nelle funzioni del sistema gastroenterico, tra cui anche l'acidosi.

5.2- Laminite

Per laminite si intende l'infiammazione asettica diffusa del derma cheratogeno, con conseguenze a livello di struttura e conformazione dell'unghione, causando zoppia. Si ritiene che sia determinata da un'alterazione della microcircolazione del derma contenuto nella scatola cornea dell'unghione, un'associazione di vasocostrizione e vasodilatazione che porta ad avere un danno ischemico localizzato al cheratogeno, che quindi produce uno strato corneo alterato in conformazione e robustezza. E' una patologia causata da una concomitanza di fattori, tra cui difetti negli appiombi, influenze genetiche sulla conformazione degli unghioni, problemi di igiene nell'allevamento (se gli animali stanno a lungo nei liquami, il corno degli unghioni si ammorbidisce favorendo l'usura meccanica ed eventuali errori di appoggio), ma anche poca attenzione alla gestione del piede nelle manze prima che vengano messe in produzione (Ward, 2009) e la concomitanza con patologie infettive e/o infiammatorie quali metriti, mastiti, dermatiti interdigitali o stati metabolici alterati, tra cui l'acidosi.

La correlazione tra lo stato acidotico e laminite non è ben chiarita, probabilmente è da attribuirsi all'entrata in circolo del LPS e dell'istamina, che hanno azione vasoattiva sui capillari e possono causare edema periferico: a livello digitale, il tessuto edematoso è contenuto nella scatola cornea dell'unghione, e non può espandersi. Il risultato di ciò è che la vasodilatazione causa un'imponente aumento della pressione intradermica, che va a comprimere i capillari: vasodilatazione e vasocostrizione causano ischemia del derma cheratogeno, che entra in sofferenza ed altera la sua capacità di deposizione dello strato corneo, fino alla morte stessa del derma, che esita nel distacco delle interdigitazioni tra podovilloso/podofilloso con cheravilloso/cherafilloso. Di questo distacco ne risente il meccanismo sospensorio della terza falange, che quindi non riesce più ad espletare perfettamente la sua azione nel mantenere il segmento osseo nella giusta posizione, e si ha una rotazione della terza falange. Nei casi gravi di laminite, oltre alle soffusioni emorragiche dovute alle cosiddette “sobbattiture” per difetti di appoggio, e alla colorazione giallastra del corno ungueale, si possono riscontrare ulcere della suola, doppia suola

(presente fin dai primi stadi come risposta allo stress sul tessuto corneo normale), conformazione anomala degli unghioni (allungati, rigati, con talloni bassi e punte lunghe e arcuate) (Nocek, 1997).

Dato che le zoppie sono tra le prime cause di riforma anticipata negli allevamenti da latte, assieme a mastiti e problemi riproduttivi, è importante prevenire questa patologia attuando dei protocolli che ricalchino il sistema HACCP attuato nella sicurezza alimentare, in modo da individuare i punti critici del meccanismo che porta allo sviluppo della laminite, e prevenirli (Ward, 2009). E' da valutare, allo stesso tempo, se la correlazione esistente tra acidosi e laminite sia quella comunemente conosciuta, che individuano l'acidosi come causa e la laminite come effetto, o se sia invece il contrario (Kleen and Cannizzo, 2012): un animale zoppo, infatti, tende a mantenere il decubito il più a lungo possibile, e una volta che ha preso la stazione quadrupedale tende ad alimentarsi il più possibile nel minor tempo possibile, andando anche a selezionare, come spiegato in precedenza, quelle frazioni della dieta che possono fornire un maggiore apporto energetico.

5.3- Acidosi metabolica

Le concentrazioni di sostanze acide presenti all'interno del rumine, e i meccanismi di rimozione dei VFA citati in precedenza (bicarbonato contenuto della saliva, in primis, ma anche bicarbonato escreto dalla mucosa ruminale tramite il meccanismo di rimozione dei VFA⁻ bicarbonato-dipendente), oltre al passaggio nel circolo ematico di alcuni di questi VFA, richiedono al soggetto un impiego notevole dei cosiddetti “*buffer*” ematici, ossia quelle sostanze disciolte nel sangue (in genere sono un acido debole e la sua base coniugata, o viceversa) volte all'alcalinizzazione e normalizzazione del pH ematico. Questo doppio utilizzo può portare alla loro deplezione, che porta allo sviluppo di una acidosi metabolica (Gianesella *et al.*, 2010). L'importanza dell'acidosi metabolica che ne consegue dipende soprattutto dalla durata del picco negativo del pH, e dalla sua profondità, in quanto un repentino crollo di questo valore per tempi più o meno prolungati comporta una incapacità dell'organismo di adattarsi alla condizione.

Nel caso in cui questa condizione sistemica si protragga a lungo, studi hanno dimostrato che i danni causati all'organismo sono vari e importanti: dalla riduzione della secrezione glucosio-dipendente di insulina, alla ipersecrezione di cortisolo,

alla riduzione della attività fagocitaria e della velocità di migrazione dei linfociti, condizioni riassumibili in uno scadimento dello stato immunitario e metabolico del soggetto, con conseguenze sia sulla salute (minor resistenza a patologie respiratorie - e non solo), sia sulla fertilità, sia sulla produttività della bovina affetta (Enemark, 2008).

5.4- Ipomotilità ruminale, meteorismo e altre alterazioni ruminali

L'accumulo di VFA, l'alterata osmolalità e il ridotto apporto di fibra, associati alla riduzione del DMI, causano una riduzione della motilità ruminale e della ruminazione, sia perché cala il DMI e si riduce la stimolazione meccanica della fibra, sia per un'azione inibitoria dei VFA sui recettori parietali. La riduzione dell'attività ruminale, il calo delle ingesta e la fermentescibilità dei substrati portano anche allo sviluppo di meteorismo (Enemark 2008). E' stato dimostrato che se si osserva meno del 40% dei bovini, in ogni momento della giornata, impegnato a ruminare, si può sospettare un pH ruminale subottimale o una disfunzionalità del rumine (Maekawa, Beauchemin, and Christensen, 2002).

L'insulto acido a livello ruminale porta alla proliferazione dell'epitelio della mucosa ruminale, che esita in una lesione tipica detta “paracheratosi”. A differenza dell'epitelio di origine, però l'epitelio così ispessito è caratterizzato da un aumento degli strati cheratinizzati ma con una riduzione della coesione tra di essi, che esita in un aumento dell'esfoliazione e nell'esposizione dei cheratinociti indifferenziati. Con questa condizione viene a mancare l'effetto barriera tipico della mucosa del rumine, che esita in una maggiore permeabilità della stessa alle sostanze esogene normalmente trattenute (Plaizier *et al.*, 2012; Steele *et al.*, 2009).

5.5- Scadimento delle condizioni corporee

Come già spiegato in precedenza, la SARA è caratterizzata da inappetenza e appetito capriccioso, incapacità di fronteggiare il NEB, mal digestione degli alimenti per alterato metabolismo microbico, ridotto assorbimento mucosale e imponente lipomobilizzazione. Tutte queste condizioni, associate allo stato infiammatorio generalizzato indotto sia dal parto, sia dalla traslocazione nel circolo ematico delle endotossine ruminali, sia dall'infiammazione del rumine stesso,

portano ad un deperimento delle condizioni corporee del soggetto colpito, riscontrabile con un calo del BCS (Kim and Suh, 2003).

5.6- Variazioni della qualità del latte

In letteratura si è sempre data grande importanza alla correlazione tra l'acidosi ruminale e il calo della percentuale del grasso nel latte (MFD, dall'inglese Milk Fat Depression), come viene citato in alcuni reviews (Enemark, 2008; Kleen *et al.*, 2003; Krause and Oetzel, 2006). Allo stesso tempo, non sono state riportate prove dell'interazione diretta tra la SARA e la MFD (Kleen and Cannizzo, 2012).

Il calo del DMI, seguito dal NEB e quindi dalla lipomobilizzazione compensatoria che caratterizzano il periodo di transizione sono sicuramente fattori che possono ridurre la montata latte nelle lattifere. Inoltre, le caratteristiche degli intermedi della lipolisi non sono bilanciati per la produzione dei componenti del latte, in quanto scarseggiano i precursori di glucosio e lattosio (nutrienti glucogenici) mentre abbondano i nutrienti lipogenici: oltre a questo squilibrio, anche lo shift nelle caratteristiche dei VFA ruminali, quindi la predominanza per esempio di alcuni acidi grassi a lunga catena *cis*- o *trans*-, o saturi piuttosto che insaturi (l'ambiente acido causa alterazioni anche nella conformazione delle sostanze contenute nel rumine, oltre che nella loro produzione ad opera della flora microbica) portano ad una difficoltà per la mammella di sintetizzare correttamente il grasso contenuto nel latte (Colman *et al.*, 2010).

Anche in questo caso, è da valutare se effettivamente è da attribuire alla SARA la responsabilità di questo calo della percentuale di grasso (per altro, non sempre riscontrata) (Gozho, Krause, and Plaizier, 2007; Keunen *et al.*, 2002), con cui sicuramente ha delle basi in comune (aumento dei concentrati e riduzione della fibra), oppure se è solo la concomitanza della presenza di SARA con le altre condizioni tipiche del periodo di transizione, e quindi con una situazione di difficoltà per la bovina (Kleen and Cannizzo, 2012).

Alcuni autori attribuivano alla SARA anche un leggero incremento del contenuto di proteine del latte, o un'inversione del rapporto tra proteina e grasso nel latte che potrebbe attribuirsi all'aumento delle proteine totali ematiche (aumentano per la presenza di uno stato infiammatorio generalizzato, e per l'emoconcentrazione

dovuta al richiamo di fluidi nel rumine) (Gozho, Krause and Plaizier, 2007) od eventualmente alla maggiore disponibilità di proteine di origine proteica all'inizio dello stato acidotico, in concomitanza con l'iniziale sovraccrescita batterica (Esposito *et al.*, 2014; Beauchemin *et al.*, 2003). Comunque sia, non ci sono evidenze di un effettivo aumento della percentuale di proteina nel latte (Keunen *et al.*, 2003).

5.7- **Problemi riproduttivi**

Importantissimo agli occhi degli allevatori, il calo della fertilità può essere rilevato da numerosi indici: parto-concepimento, *days open*, parto-primo calore etc. Può essere associato alla SARA per le cause sopra citate (calo del DMI, stress metabolico da NEB, stati infiammatori, etc.), concomitanti allo stato acidotico: il meccanismo patogenetico che li associa non è ancora chiarito nei dettagli, ma probabilmente è da attribuirsi ai mediatori dell'infiammazione presenti nella circolazione sistemica, che possono agire anche a livello ovarico (luteolisi, ritardo nella maturazione follicolare etc.) (Enemark, 2008) e, indirettamente, uterino (lo stress cui va incontro l'animale nel periodo di transizione e la condizione di infiammazione generalizzata causano una riduzione dell'attività dei leucociti, con conseguente, ad esempio, ritardo nell'involutione uterina) (Esposito *et al.*, 2014).

5.8- **Altre patologie**

Sia le condizioni immuno-endocrino-metaboliche delle bovine nel periodo di transizione, sia l'azione vasoattiva e di stimolazione del sistema immunitario ad opera del LPS e dell'infiammazione acido-indotta della parete del rumine causano un'intensa produzione di citochine e chemochine (tra cui l'istamina), che portano ad una situazione di infiammazione generalizzata, stress e ad un calo della risposta immunitaria nei vari distretti dell'organismo che possono essere particolarmente sollecitati in questa fase. Ecco che quindi si può riscontrare una maggiore incidenza di mastiti, metriti, ritenzioni di placenta (si ha una riduzione della marginalizzazione dei leucociti, quindi una ridotta attività di lisi delle caruncole e involuzione uterina ritardata) e altre patologie infettive per esempio alle vie respiratorie (Enemark, 2008). Le mastiti, inoltre, essendo indicatori diretti di una

perdita economica, sono una causa tra le più importanti che inducono gli allevatori a riformare anticipatamente le vacche.

Nel rumine, l'insulto acido a livello epiteliale causa ulcere e lesioni, e la stimolazione ad un ispessimento difensivo della mucosa chiamato paracheratosi, che però non mantiene le stesse caratteristiche di coadesione intercellulare: anzi, le *tight junction* che dovrebbero impedire la traslocazione extracellulare di batteri e loro prodotti (LPS) vedono un calo della loro funzionalità proprio in caso di stimolazioni antigeniche e da citochine, variazioni nella dieta, stress psicologico etc, e la mucosa risulta più permeabile (Plaizier *et al.*, 2012). La riduzione dell'efficacia della barriera mucosale permette il passaggio di tossine e batteri prima nella sottomucosa, poi nel circolo ematico, causando infiammazione (ruminite), ascessi nella parete del rumine, e, se è presente anche il *Fusobacterium necrophorus*, ascessi metastatici al fegato (Rumenitis Liver Abscess Complex) e occasionalmente ai polmoni tramite la vena cava caudale (determinando la sindrome della vena cava caudale). In questo ultimo caso si possono riscontrare epistassi ed emottisi, con la formazione di abbondante schiuma rosata su bocca e narici, con decorso generalmente fatale (Enemark, 2008).

In caso di SARA, i soggetti colpiti presentano una riduzione del DMI come conseguenza delle fluttuazioni dell'osmolalità; allo stesso tempo, le grandi richieste energetiche dovute alla lattazione spingono le bovine ad assumere fonti energetiche, anche a discapito del contenuto di fibra, per ridurre il NEB. Si parla quindi di appetito capriccioso come segno tipico in corso di acidosi, anche se non è assolutamente da ritenersi specifico di questa patologia (ad esempio, la dislocazione abomasale è caratterizzata tipicamente dalla presenza di appetito capriccioso). Il NEB, presente sia per la concomitante lattazione sia per questa riduzione dell'assunzione di alimento, porta ad un aumento dei fattori lipolitici nel torrente circolatorio, che esita nella mobilitazione delle riserve corporee, rappresentate dal tessuto adiposo. La massiva lipomobilitazione porta ad uno squilibrio tra la produzione di metaboliti glucogenici (in primis, l'acido propionico (C3)) e metaboliti lipogenici (acido acetico (C2) e acido butirrico (C4)), in favore di questi ultimi: a livello di circolazione ematica quindi si avrà un sovraccarico dei prodotti intermedi di questo metabolismo, ossia i corpi chetonici, rappresentati da acetone, acetoacetato e β -idrossibutirrato (BHB). Quando i corpi chetonici raggiungono

concentrazioni elevate nel sangue possono indurre uno stato di chetosi (van Knegsel *et al.*, 2007).

Acidosi ruminale e chetosi, quindi, risultano essere interdipendenti: l'acidosi, causando un calo notevole dell'ingestione di alimenti e una riduzione dell'efficacia della digestione dei componenti della dieta, può indurre chetosi per eccessiva lipomobilizzazione; allo stesso tempo, una chetosi primaria, determinando un'assunzione incostante di alimento, può sfociare in acidosi ruminale nel momento in cui le bovine recuperano l'appetito e aumentano la loro ingestione di alimento (Fantinati, 2008).

La chetosi, per l'azione atonizzante dei corpi chetonici sulla muscolatura liscia gastroenterica, è indicata come condizione predisponente alla dislocazione abomasale; anche l'azione irritativa delle ulcere e delle lesioni della mucosa ruminale possono portare a peristalsi anomala e atonia, con conseguente accumulo di gas e possibile dislocazione dell'abomaso. Nessuna relazione certa è però stata stabilita ad oggi (Enemark, 2008).

6- DIAGNOSI

Data la quantità di situazioni concomitanti e la relativa sintomatologia, e la discrepanza ancora presente tra le definizioni di SARA, diagnosticarla precocemente è ancora piuttosto complicato. E' però fondamentale, viste le numerose complicazioni che possono associarsi.

6.1- Anamnesi e valutazione clinica della mandria

La SARA è una patologia di gruppo, e, per quanto non si manifesti in maniera evidente, mantenendo controllate le attività routinarie e le condizioni della mandria si possono avere dei sospetti sulla presenza dello stato acidotico. Rilevare meno del 40% dei soggetti che ruminano, in un qualsiasi momento della giornata; osservare un deperimento degli animali, soprattutto delle bovine che producono di più; notare un calo della consistenza delle feci, sia guardando la lettiera sia gli animali stessi (gli animali con diarrea spesso sono imbrattati in zona perineale e su coda e mammella); evidenziare un aumento nell'incidenza di alcune patologie quali mastiti, metriti e

ritenzioni placentari, ed un aumento della percentuale di rimonta, può portare ad un sospetto della presenza di SARA in allevamento.

6.2- Analisi dell'alimento

Una delle prime metodiche che si possono adoperare nel caso ci sia sospetto di SARA è l'analisi dell'alimento, per escludere una causa prettamente alimentare; analisi quali-quantitative andrebbero comunque eseguite periodicamente sulla razione, sia su quella appena miscelata sia sul residuo in mangiatoia, per mantenere monitorata la qualità degli alimenti somministrati nella dieta, modularne al meglio il bilanciamento all'interno dell'unifeed o della razione frazionata, e garantire il corretto apporto di energia e componenti fibrose. La composizione della razione deve essere costante, senza significative differenze tra ciò che viene distribuito agli animali e quello che ne rimane. Vengono valutati soprattutto i seguenti parametri, secondo la tecnica di van Soest (Van Soest, Robertson and Lewis, 1991):

-NDF (Fibra resistente al Detergente Neutro): in diete somministrate come unifeed si consiglia un minimo di 25% di NDF sul totale della sostanza secca (SS), di cui almeno il 75% deve provenire da foraggi; nel caso fosse prevista una percentuale inferiore di foraggi, o nel caso si somministri la dieta a componenti frazionate, è necessario un maggiore apporto di NDF per prevenire il rischio di acidosi (NRC, 2001). Si valuta anche la $peNDF$, che dipende direttamente sia dalla quantità di NDF, sia dalla lunghezza delle particelle e dalla loro resistenza all'azione masticatoria.

-ADF (Fibra resistente al Detergente Acido): dovrebbe avere un valore superiore al 19% della SS.

-NFC (Carboidrati Non Strutturali): ad es. gli amidi, sono le fonti energetiche principali e il loro valore all'interno della dieta dovrebbe essere tra il 30 e il 40% della SS. Il rapporto tra NFC e NDF dovrebbe oscillare tra $NFC/NDF = 1,1-1,2$ per le lattifere più produttive e $NFC/NDF = 0,9$ per quelle meno produttive.

-PG (Proteina Grezza): fondamentale per l'efficienza delle fermentazioni ruminali è l'equilibrio tra l'apporto di fonti energetiche e amminoacidiche o di azoto, in modo che ci sia una sufficiente produzione di proteine microbiche per il mantenimento dei corretti livelli di fermentazione, e al contempo non ci sia spreco di azoto sotto

forma di ammoniaca, che potrebbe avere conseguenze tossiche per il soggetto o livelli troppo alti a livello di latte. Per le bovine con una produzione giornaliera superiore ai 35 kg/d di latte si consiglia un tenore proteico di circa il 16-17% sulla SS, tenendo comunque presente della degradabilità della proteina somministrata.

-EE (Estratto Etereo): per aumentare le risorse energetiche della dieta si può ricorrere a grassi di origine vegetale fino ad una quota non superiore al 5% sulla dieta.

-MACRO- e MICRO-ELEMENTI: anche il corretto apporto di macroelementi quali Sali Anionici o Bicarbonato, o microelementi quali Selenio o Rame nella dieta è importante per garantire l'equilibrio nella fisiologia della bovina lattifera (Bittante, Andrighetto and Ramanzin, 2005).

6.3- Valutazione del pH ruminale

Misurare direttamente il liquido ruminale è la metodica al momento ritenuta “golden standard” per la diagnosi della SARA in campo, quando si riesce a valutare il contenuto ruminale di un numero statisticamente significativo che rappresenti gli animali presenti in azienda. In una prova condotta presso University of Wisconsin-Madison Dairy Cattle Center (Madison, WI), sono stati valutati i pH ruminali di 48 vacche di razza Frisona dopo prelievo tramite ruminocentesi, per individuare dei valori guida per la valutazione del pH ruminale in campo, sia per quanto riguarda la numerosità del campione, sia per quanto riguarda il valore del pH. Dall'analisi statistica di questi dati è scaturita l'unica proposta di modello diagnostico per la SARA finora accettato e comunemente utilizzato: se, in un gruppo di 12 animali selezionati casualmente all'interno della mandria (possibilmente, animali a rischio di acidosi, quindi convenzionalmente sotto i 100 giorni in lattazione, ma senza sintomatologia clinica), almeno 3 presentano un pH pari o inferiore a 5,5, l'azienda è da considerarsi a rischio di acidosi (Garrett *et al.*, 1999). Il momento migliore per avere un effettivo riscontro del picco di acidità è circa 4-8 ore dopo la somministrazione dell'unifeed, o 2-4 ore dopo la somministrazione dei concentrati nel caso la razione sia distribuita a componenti separate.

Oltre alla fistola ruminale, un'apertura permanente sul fianco sinistro del bovino, in corrispondenza del rumine, mantenuta sigillata da un tappo con guarnizione, che

permette l'accesso diretto al lume del rumine e che viene utilizzata solo per alcune prove sperimentali ma che non è più permessa in Italia, i metodi di prelievo del liquido ruminale sono:

- **SONDA ORO-RUMINALE** (Nocek, 1997): è un tubo di plastica flessibile di circa 3,5 m di lunghezza, a cui è attaccata una pompa aspirante. Viene sospinto in esofago e quindi nel rumine, in modo da aspirarne il liquido contenuto. I valori di pH rilevati da un campionamento svolto in questo modo però non sono precisi, dato che variano in base alla localizzazione dell'estremo della sonda, all'azione della pompa nel rumine – che creando turbolenze può alterare il contenuto di CO₂ –, al tempo di prelievo rispetto la somministrazione della razione e al grado di contaminazione del campione con la saliva (la saliva del bovino ha un pH che si aggira attorno a 8, ed anche una piccola percentuale di saliva può alterare significativamente il pH del campione). Il pH dei campioni prelevati con sonda o con ruminocentesi differisce per valori che variano da 0,28 a 1,1 (Enemark, 2008).

- **RUMINOCENTESI**: è la tecnica d'elezione, in quanto è la metodica che meno altera i valori del pH del liquido ruminale, ed è ritenuta un ottimo strumento diagnostico per la valutazione su larga scala, cioè della mandria (O'Grady, Doherty, and Mulligan, 2008; Morgante *et al.*, 2007). La ruminocentesi si esegue prelevando con un ago il contenuto liquido dal sacco ventrale del rumine, seguendo la metodica indicata da Nordlund e Garret nel 1994 (Nordlund and Garrett, 1994). Sul liquido ruminale si possono eseguire molte valutazioni, oltre al pH: il contenuto in AGV, la conta protozoaria, colture batteriche etc. E' una metodica sicura, poco invasiva, senza grossi effetti collaterali e ben tollerata dai soggetti, e rappresenta un buon compromesso tra efficacia nella rilevazione dei parametri richiesti e tempi per la messa in pratica di queste misurazioni.

- **BOLO ENDORUMINALE**: sono apparati wireless di rilevazione in continuo dei valori di pH a livello ruminale o reticolare. Generalmente a forma di proiettile, in materiale inerte, spesso dotati di “alette” che ne riducono il rischio di rigurgito, sono costituiti da un rilevatore di pH, un processore, una radiotrasmittente e una batteria; alcuni sono dotati di una memoria interna, oltre che di altri sensori (temperatura e pressione). Vengono somministrati oralmente tramite uno “sparaboli”. Sono ancora in fase di studio, anche se le comparazioni tra le misurazioni da essi effettuate e quelle “a spot” delle ruminocentesi hanno

dimostrato la loro efficienza per l'utilizzo in campo (Enemark, 2008). Ad oggi sono utilizzati solo per prove sperimentali, sia per il costo elevato, sia per la scarsa durata delle batterie, che non permetterebbero una rilevazione costante per tutta la vita produttiva della vacca (Gasteiner *et al.*, 2012; Kimura *et al.*, 2012; Sato, Kimura, *et al.*, 2012; Sato, Mizuguchi, *et al.*, 2012; Penner, Beauchemin, and Mutsvangwa, 2006).

6.4- Valutazione dei parametri ematici

Anche se ben tollerata e precisa, la ruminocentesi rimane una metodica piuttosto invasiva e non particolarmente pratica da eseguire routinariamente in campo, in quanto richiede tempo (circa 15' per animale), il contenimento di più animali e la cooperazione di più persone. Quindi, oltre alle rilevazioni via bolo endoruminale, si potrebbero indagare i parametri ematici, per riscontrare eventuali alterazioni che possano essere predittive di SARA. Ad oggi non sono stati ancora rilevati parametri che specificatamente indichino la presenza di SARA.

- EMOGASANALISI: le emogasanalisi permettono la valutazione sul sangue di parametri relativi sia ai gas disciolti nel sangue (ossigeno, anidride carbonica), sia a elettroliti e altri composti (calcio - Ca, sodio - Na, potassio - K, magnesio - Mg, fosforo inorganico - Pi, come anche bicarbonato - HCO_3^- e fosfati - HPO_4^{2-} , e glucosio). Dato il delicato periodo in cui facilmente insorge l'acidosi ruminale, ossia il primo post parto, gli elementi minerali (Ca, Na, Pi, K) sono mantenuti sotto stretto controllo da vari processi omeostatici, senza mostrare quindi grandi variazioni in corso di acidosi ruminale.

Abbiamo detto che, a causa della quantità di acidi organici che passano nella circolazione ematica, e della quantità di bicarbonato e altri *buffer* che vengono richiamati all'interno del ruminale, si può raggiungere una condizione di acidosi metabolica (Gianesella *et al.*, 2010), la cui entità dipende dalla durata e dalla gravità dell'insulto acido. A livello ematico, l'acidosi metabolica si rileva con una riduzione del normale *base excess* ematico, ossia della quantità di soluti tampone circolanti, ed un calo del pH ematico, segno del sovraccarico del sistema di *buffering* ematico (Gianesella *et al.*, 2010). E' da tenere presente, però, che l'omeostasi acido-base soprattutto a livello ematico ha la precedenza su crescita, lattazione e riproduzione

(Freedden, DePeters, and Baldwin, 1988), e quindi difficilmente si avranno delle variazioni significative di questi parametri in corso di acidosi ruminale.

L'acidosi metabolica si può comunque evidenziare in un'alterazione della quantità di HCO_3^- disciolto nel sangue, che decresce, essendo il più importante *buffer* utilizzato per rialzare il pH ruminale ed ematico; anche i valori di pO_2 (pressione parziale di ossigeno), O_2Hb (emoglobina ossigenata), O_2 calano in corso di acidosi metabolica, ed aumentano la pCO_2 (pressione parziale di CO_2 : aumenta per la riduzione dello ione bicarbonato circolante) e la RHb (emoglobina ridotta) (Jones, 2010). Queste modificazioni della disponibilità di ossigeno a livello periferico inducono la caratteristica iperventilazione compensatoria (Dehkordi and Dehkordi, 2011).

- LPS: in corso di acidosi ruminale, la barriera epiteliale della mucosa del rumine viene meno, permettendo la traslocazione di un certo quantitativo di LPS attraverso la parete del rumine fino al circolo ematico. L'endotossiemia che ne consegue causa uno stato infiammatorio generalizzato (Plaizier *et al.*, 2012).

Il LPS circolante nel sangue periferico, però, non aumenta significativamente; questo aspetto può dipendere da due aspetti, fondamentalmente: un'inadeguatezza della sensibilità del sistema di rilevazione, e dalla velocità della clearance del LPS dal circolo ematico, a opera della LBP (LPS Binding Protein, una proteina infiammatoria), delle cellule di Kupffer a livello epatico, e delle lipoproteine, a cui viene trasferito grazie alle LBP (Plaizier *et al.*, 2012).

- RISPOSTA DI FASE ACUTA: in corso di acidosi, in qualsiasi forma essa si presenti, causa uno stato infiammatorio a livello sistemico sia per l'insulto diretto del pH sul rumine, e quindi il danno a livello di mucosa, sia per le endotossine rilasciate in circolo. Questa condizione è rilevabile andando ad analizzare la produzione delle Proteine di Fase Acuta (APP, dall'inglese Acute Phase Proteins). Queste proteine sono prodotte in risposta alla stimolazione infiammatoria esercitata da alcune citochine, in particolare IL-1, IL-6, $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$ (nell'ordine: Interleuchina 1, Interleuchina 6, Tumor Necrosis Factor α e Interferone γ), e sono distinguibili in APP positive e APP negative. Le APP positive sono caratterizzate da un aumento rapido in fase infiammatoria acuta e una diminuzione più lenta in fase di guarigione, mentre quelle negative decrescono in risposta allo stato infiammatorio. Le APP positive sono ulteriormente suddivisibili in maggiori, che

aumentano di 100-1000 volte, con un picco dopo 24-48h dall'insorgenza dello stimolo; moderate, che aumentano di 5-10 volte con un picco entro 2-3 giorni; e minori, che aumentano gradualmente del 50-100% rispetto alla concentrazione normale.

In corso di acidosi ruminale uno degli stimoli maggiori che riceve l'organismo avviene da parte del LPS assieme ad altri prodotti microbici quali etanolo, metanolo, istamina e tiramina (Owens *et al.*, 1998). Due APP, la Sieroamiloide A (SAA) e la proteina legante il LPS (LBP) sono direttamente coinvolti nella rimozione dell'endotossina dal circolo ematico: la SAA aumenta di circa 1000 volte, lega i monomeri dell'endotossina ed è quindi rimossa dai macrofagi epatici. La misurazione della SAA è complicata dal suo coinvolgimento nell'attività delle lipoproteine ad alta densità, in cui si ritiene che sostituisca la frazione ApoA-1 (Coetzee *et al.*, 1986).

La LBP invece permette il trasferimento dell'endotossina ai macrofagi o alle lipoproteine, neutralizzandone l'induzione della risposta infiammatoria (Plaizier *et al.*, 2012).

La rimozione del LPS dal circolo ematico, coadiuvato dalla LBP, avviene nelle cellule del Kupffer a livello epatico, e può essere associato ad un aumento in circolo della aspartato-aminotrasferasi (AST), un enzima che funge da indicatore aspecifico di alterazione epatica.

Un'altra importante APP è l'aptoglobina (Hp), che lega l'emoglobina per evitare l'utilizzo del ferro in essa contenuto da parte dei batteri, che ne necessitano per moltiplicarsi.

Nel bovino, l'Hp è ritenuta un buon marker di infiammazione, come dimostrano sia studi sperimentali (Conner *et al.*, 1988) sia di campo (Nakagawa *et al.*, 1997), mentre per la SAA non è stato dimostrato il valore diagnostico.

Uno studio ha dimostrato l'utilità di SAA e Hp per la discriminazione tra infiammazione acuta e cronica (Horadagoda, Knox and Gibbs, 1999): la SAA ha dimostrato la più alta sensibilità (100%), l'Hp la maggiore specificità (76%); la conta neutrofilica e la conta dei neutrofili a banda hanno dimostrato sensibilità del 71% e del 42%, e specificità del 30% e del 72% rispettivamente.

La SAA è considerato un migliore indicatore di infiammazione acuta, piuttosto che cronica.

Purtroppo però, il momento di maggior suscettibilità allo sviluppo di SARA è, per le bovine lattifere, un momento di notevole stress in cui sono coinvolti numerosi indicatori biologici (citochine, cortisolo, insulina oltre alle APP) che controllano congiuntamente la risposta ai cambiamenti che avvengono nell'organismo, modulandola: la disparità nelle variazioni dei livelli delle APP in corso di SARA probabilmente dipende dalle diverse citochine coinvolte (Jacobsen *et al.*, 2004).

Uno studio ha dimostrato una maggiore concentrazione di SAA e Hp a livello periferico piuttosto che nella vena porta, il che può probabilmente indicare che la risposta infiammatoria sistemica che si riscontra in caso di SARA potrebbe essere indotta prevalentemente dalle reazioni causate dall'acidosi metabolica, piuttosto che dai processi che avvengono all'interno dell'apparato gastroenterico (Danscher *et al.*, 2011).

- EMATOCRITO E ALTRI PARAMETRI EMATICI: è stato dimostrato un aumento dell'ematocrito (HCT), della conta dei globuli rossi (RBC) e dell'emoglobina, probabilmente ritenibili aumenti relativi dovuti ad emoconcentrazione. L'aumentata osmolalità del contenuto ruminale infatti richiama liquidi prelevandoli dal torrente circolatorio e dallo spazio extracellulare, causando appunto emoconcentrazione e disidratazione). Inoltre è stato rilevato anche un aumento della conta piastrinica (PLT), che potrebbe essere la risposta dell'organismo all'insorgenza di lesioni alla mucosa del rumine in caso di acidosi ruminale (Steele *et al.*, 2009).

7- PREVENZIONE E TERAPIA

Una volta individuata la metodica per l'identificazione precoce dell'insorgenza dell'acidosi ruminale, o quanto meno per la conferma del sospetto della presenza dell'acidosi in campo, gli interventi che possono essere attuati per ridurre l'incidenza e limitarne i danni sono numerosi.

Innanzitutto, è opportuno assicurarsi che la formulazione e la distribuzione dell'alimento siano ottimali, fornendo l'alimentazione necessaria al mantenimento della produzione latte nel rispetto delle condizioni fisiologiche della bovina. Una

razione bilanciata, che soddisfi i requisiti per preservare la salute della bovina pur mantenendo intatti i parametri di qualità e quantità del latte che questa andrà a produrre, può infatti garantire una riduzione delle spese mediche e di riforma a carico dell'allevatore. A questo scopo è necessario prestare molta attenzione sia alle caratteristiche dei componenti della razione, sia alla modalità di preparazione (ad esempio, durata della miscelazione nel carro miscelatore, per evitare un eccessivo sminuzzamento della fibra; oppure umidità della dieta), sia alla modalità con cui la dieta viene distribuita alle bovine. Per questo sarebbe ottimale cercare di garantire l'accesso alla razione in maniera uniforme alla mandria durante la giornata, e correggendo gli eventuali errori gestionali (per esempio, in caso di sovraffollamento delle corsie). Si possono sostituire le fonti amidacee di energia con fonti lipidiche, meno fermentescibili e i cui metaboliti sono di diretto utilizzo da parte della mammella.

Dato che uno dei fattori predisponenti allo sviluppo della SARA è il passaggio brusco dall'alimentazione fibrosa tipica dell'asciutta all'alimentazione ricca di amidi somministrata in lattazione, si può ridurre il rischio di insorgenza garantendo un adattamento graduale delle bovine alla dieta: questo è possibile frazionando l'aumento del contenuto energetico (e fermentescibile) nella dieta in un tempo di circa 4 settimane, in modo da permettere alla mucosa del rumine e alla sua flora microbica di adeguare la propria risposta a questa variazione.

Un'altra possibilità per il controllo delle fermentazioni ruminali è la somministrazione di *buffer* alimentari, allo scopo di ridurre il consumo dei *buffer* endogeni. Con la dieta si possono somministrare alimenti con una capacità di *buffering* maggiore: la BC degli alimenti dipende dalla capacità dei loro microcomponenti (proteine e lignine) di accettare protoni e rilasciare cationi (Dijkstra *et al.*, 2012). Per implementare l'effetto della dieta sul pH si possono utilizzare additivi minerali quali bicarbonato di sodio (NaHCO_3) o ossido di magnesio (MgO), in piccole proporzioni (5-10 g/kg DM e 3-8 g/kg DM, rispettivamente). Entrambi sono spesso utilizzati dagli allevatori, ed hanno dimostrato una buona efficacia, ma MgO è poco appetibile ed ha effetto ritardato – (effetto dopo 24 ore dalla somministrazione); NaHCO_3 ricalca l'attività dello ione HCO_3^- endogeno, accettando protoni e richiamando liquidi nel rumine – causa diluizione (Calsamiglia *et al.*, 2012).

Alcuni studi hanno dimostrato che addizionando alla razione preparati contenenti batteri lattico-utilizzatori o lieviti si ha un miglioramento delle condizioni del rumine ed una riduzione del rischio di sviluppare acidosi ruminale e metabolica (Beauchemin *et al.*, 2003; Ghorbani *et al.*, 2002). In questi studi è stato dimostrato che la somministrazione di ceppi microbici controllati, o di lieviti o estratti di lieviti, induce una riduzione della $p\text{CO}_2$ e della lattato deidrogenasi (LDH, dall'inglese Lactate De-Hydrogenase), un enzima circolante il cui aumento è indice della necessità di metabolizzare grandi quantità di acido lattico proveniente dal metabolismo tissutale e dalle degradazioni a livello intestinale. Alcuni studi dimostrano come un preconditionamento delle partorienti ad elevate concentrazioni di lattato, messo in atto addizionando lattato alla dieta nelle ultime settimane di asciutta, favorisca una riduzione del rischio di sviluppo di acidosi (Krause and Oetzel, 2006).

Altra strategia, ma piuttosto controversa, è l'utilizzo di antibiotici ionofori per selezionare una flora microbica più favorevole all'ambiente che si viene a creare somministrando diete ricche di substrati fermentescibili (Annison *et al.*, 2007; Stone, 2004).

SCOPO

Data l'importanza economica dell'acidosi ruminale, soprattutto nella sua forma subacuta (SARA), e la difficoltà per gli allevatori di coglierne i primi segnali, si sta cercando di individuare un sistema di rilevazione che si possa utilizzare di routine, senza grossi sforzi economici da parte delle aziende e senza grossi impegni in termini di tempo per i veterinari buiatri: una combinazione di misurazioni ed osservazioni in campo potrebbe portare ad un compromesso soddisfacente anche dal punto di vista della precocità di diagnosi, garantendo al veterinario un margine di azione migliore, e permettendogli di riscuotere maggiori successi con eventuali interventi terapeutici. Questa tesi ha lo scopo di indagare le possibili metodiche utilizzabili in campo per il controllo dei parametri ruminali ed ematici in corso di acidosi ruminale.

MATERIALI E METODI

ANIMALI E CONDIZIONI DI STABULAZIONE

La prova sperimentale si è svolta tra settembre e novembre 2011, presso l'azienda agricola sperimentale “La Decima” di proprietà della provincia di Vicenza, sita in Montecchio Precalcino.

La prova è stata condotta su sei manze non gravide, incrocio Valdostana x Blu Belga, dell'età di circa sei mesi e del peso di 334 ± 14 kg. Gli animali sono stati allevati a stabulazione libera in un box di 88 mq, riparato da un tetto e con ventilazione naturale, caratterizzato da un'area di alimentazione con una pavimentazione in cemento pieno e un'area di riposo a lettiera permanente; la paglia per la lettiera è stata aggiunta giornalmente, ad eccezione delle settimane di rilievi, durante le quali la paglia non è stata cambiata per ridurre il rischio che le manze la utilizzassero come alimento.



Figura n.1, Figura n.2. Gli animali oggetto della sperimentazione.

DISEGNO SPERIMENTALE E DIETE

A ciascuna delle sei manze è stato applicato un bolo endoruminale. Nell'ambito di un protocollo sperimentale a “quadrato latino” 3×3 (3 diete x 3 periodi) ogni animale è stato assegnato in modo casuale ad uno di tre gruppi sperimentali, a cui sono state somministrate, nei diversi periodi, secondo un protocollo di induzione, tre diete che si differenziano per il contenuto in amido: Controllo, 17,3% ss (CT), una dieta a medio contenuto di amido, 33,4% ss, per indurre un'acidosi ruminale

subacuta (MS) ed una dieta ad alto contenuto d'amido, 42,8% ss, per indurre un'acidosi ruminale acuta (HS), come riportato in Tabella n.1.

Prima dell'inizio della prova agli animali sono stati lasciati 15 giorni per acclimatarsi alle condizioni di stabulazione e alla dieta CT. Ogni periodo è stato caratterizzato da 3 giorni di preconditionamento e da 5 giorni in cui si è applicato il protocollo di induzione dell'acidosi ruminale ed in cui sono avvenuti i rilievi sperimentali. A questi 8 giorni sono seguite 2 settimane durante le quali non sono stati eseguiti rilievi e gli animali sono stati alimentati *ad libitum* con la dieta CT.

PROTOCOLLO DI INDUZIONE DELL'ACIDOSI RUMINALE

Dopo 15 giorni di alimentazione *ad libitum* con la dieta CT, per poter indurre l'acidosi ruminale, per 3 giorni (d-3, d-2, d-1) la razione è stata suddivisa in tre pasti (ore 8.00, 12:00 e 18:00). Il giorno successivo (d0) gli animali sono stati sottoposti ad un regime di restrizione alimentare (dieta CT somministrata solamente alle ore 08:00 e 12:00), mentre dal d1, *challenge day*, gli animali appartenenti ai vari gruppi sono stati alimentati 3 volte al giorno con una delle tre diete (CT, MS e HS), per poi tornare, una volta raggiunta l'acidosi, ad essere alimentati 3 volte al giorno con la dieta CT.

RILIEVI ED ANALISI

1- PESO E BODY CONDITION SCORE (BCS)

Le manze sono state pesate e visitate prima dell'inizio della sperimentazione, ed è stato assegnato loro un punteggio BCS; alla fine della prova sono state nuovamente pesate, visitate ed è stato nuovamente determinato il BCS.

2- INGESTIONE

Per poter misurare l'ingestione individuale, durante i 3 giorni di preconditionamento e i 5 giorni di rilievi, le manze sono state alimentate individualmente agli orari predefiniti mettendo loro a disposizione 10 kg per pasto della rispettiva dieta e fornendo costantemente acqua. Dopo circa 1,5 h (si è atteso che tutti gli animali avessero smesso di mangiare da almeno 10 minuti) l'alimento residuo lasciato da ciascun animale è stato rimosso e pesato per poter calcolare l'ingestione ad ogni pasto. La quantità di alimento assunto giornalmente

da ogni singolo animale è stata calcolata sommando le quantità ingerite nei singoli pasti. Campioni delle razioni e dei residui sono stati raccolti giornalmente per le analisi compositive (AOAC, 2003; Van Soest *et al.*, 1991).

Tabella n.1. Formulazione e composizione della dieta.

INGREDIENTI, % DM	TRATTAMENTO ¹		
	CT	MS	HS
Foraggio di prato stabile, 1° taglio	29,0	19,1	14,5
Fieno di medica disidratata	16,4	10,6	7,6
Miscela a base di soia ²	15,7	10,8	7,9
Polpe di barbabietola essiccate	6,3	4,3	3,2
Mix di cereali ³	25,6	16,1	13,0
Semi di lino spezzati	4,5	3,1	2,0
Melassa	0,3	0,1	0,1
Vitamine e integratori minerali	2,1	1,5	1,3
Farina di mais (0,5 mm)	0,0	34,4	50,4
COMPOSIZIONE DELLA DIETA			
DM, %	89,1	87,6	87,8
Proteina grezza, %DM	16,4	14,3	13,2
Estratto etereo, %DM	4,5	4,2	4,2
Ceneri grezze, %DM	8,7	6,2	5,0
NDF, %DM	33,0	26,3	20,9
Amido, %DM	17,3	33,4	42,8
Energia netta per la lattazione, MJ/kg DM	6,91	7,66	8,00

¹ - CT: controllo; MS: dieta a medio contenuto di amido; HS: dieta ad elevato contenuto di amido.

² - 58% farina di soia e 42% pannello estruso di soia decorticata.

³ - 70% farina di mais e 30% farina di orzo.

3- VALUTAZIONE DEL PH RUMINALE

a. tramite l'utilizzo di boli

Il pH è stato misurato ogni 10 minuti per tutta la durata del periodo sperimentale (da settembre a novembre) tramite l'utilizzo di boli endoruminali prodotti dalla Kahne

Limited (Auckland, New Zealand). I boli endoruminali sono sistemi di rilevazione in continuo del pH e sono stati progettati per essere somministrati *per os* agli animali e galleggiare nel liquido ruminale.

I boli utilizzati in questa prova, denominati KB1101, esternamente presentano un involucro in maneriale inerte a forma di proiettile, di 145 mm di lunghezza per 27 mm di diametro, e sono dotati di alette anti-rigurgito di 185 mm da un estremo all'altro, le quali sono mantenute ripiegate contro il congegno durante il suo inserimento all'interno dell'animale; hanno un peso di circa 70 g: le dimensioni ridotte ed il peso contenuto fanno sì che il bolo non interferisca con il normale funzionamento dei prestomaci.

Il modello da noi utilizzato è dotato di un sensore per la pressione interna del rumine, un rilevatore di temperatura e un sensore ISFET (Ion-Sensitive Field Effective Transistor) per la misurazione del pH.

Sono dotati di una batteria al litio la cui durata dipende dalla frequenza di registrazione e trasmissione dei dati: si stima che possano mantenere la loro efficienza per un periodo compreso tra i 2,5 e i 5 anni.

Hanno una memoria interna, e un CPU (processore), che permette ad ogni singolo bolo di immagazzinare più di 10,000 informazioni: i dati vengono inviati ad un'antenna di campo, che può essere dotata di una memoria flash SD per raccogliere i dati trasmessi dai boli ogni qual volta gli animali siano in posizione favorevole: la trasmissione è possibile entro un raggio di circa 30 m, tenuto presente che la localizzazione del bolo all'interno del rumine e l'ambiente interno dell'animale possono influenzare la trasmissione dei dati, e che l'antenna ha un campo di ricezione direzionale con un'ampiezza di circa 110°.

I dati registrati durante la sperimentazione sono stati scaricati alla fine di ogni settimana di prova all'interno di un computer portatile contenente un software apposito, ed organizzati in fogli Excel in base all'animale (ogni bolo è dotato di un numero identificativo univoco a 10 cifre che ne permette l'associazione ad ogni animale) e alla settimana di prova. Con le rilevazioni giornaliere del pH sono stati individuati i valori di nadir, massimo e media del pH; sono stati inoltre individuati tre pH soglia: (1) $\text{pH} < 5,0$; (2) $5,0 < \text{pH} < 5,5$; (3) $5,5 < \text{pH} < 5,8$; è stata quindi

evidenziata la quantità di tempo in cui le manze hanno avuto valori di pH contenuti in queste categorie.



Figura n.3. Antenna di campo.



Figura n.4. Il bolo endoruminale KB1101.

b. tramite ruminocentesi

Al quarto giorno di prova (d3), per tutte e tre le settimane di sperimentazione, è stata effettuata una ruminocentesi a ciascun animale a circa 4 ore dalla precedente somministrazione di alimento (Morgante *et al.*, 2007). La tecnica utilizzata è quella descritta da Nordlund e Garrett (Nordlund and Garrett, 1994) e migliorata da Ganesella *et al.* (2010). Ogni animale è stato contenuto in stazione quadrupedale, in cattura; al momento del prelievo alla bovina è stata legata la testa alla rastrelliera dell'autocattura rivolta verso il lato sinistro, in modo che potesse vedere l'operazione, un operatore ha immobilizzato la testa, eventualmente agendo sul naso, mentre un altro operatore spingeva la coda verso l'alto, posizionandosi dietro all'animale. E' stata eseguita la tricotomia di un quadrato 10 x 10 cm sul fianco sinistro, circa 15 cm caudalmente alla congiunzione costo-condrale dell'ultima costa, all'altezza dell'articolazione del ginocchio ed è stato preparato il campo chirurgico tramite disinfezione con tre passaggi alternati di soluzione iodata (iodopovidone: Betadine® soluzione cutanea 10%) ed alcool .

E' necessario prestare molta attenzione al reticolo vascolare sottocutaneo, ben visibile sulla cute tricotomizzata e bagnata, per evitare di provocare emorragie e contaminare col sangue il campione di liquido ruminale (una contaminazione ematica anche molto ridotta può falsare la rilevazione del pH, alcalinizzandolo). Preparato il campo, si procede ad un ballottamento a pugno chiuso e, mantenendo con questo una pressione costante sul punto dove andrà eseguita la centesi, si punta

l'ago (nel nostro caso, un ago di 105 mm e 13G, Intranule PP, Vygon, France) fornendo una spinta costante e perpendicolare alla parete del rumine: quando l'animale rilascia la parete addominale e cessa la contrazione di addome e rumine indotta dalla pressione del pugno, si inserisce l'ago nel sacco ventrale del rumine, rimuovendo gradualmente il pugno. All'ago viene applicata una siringa da 20 ml contenente circa 10 ml di aria, che serve per sospingere eventuali particelle solide che vanno ad ostruire il lume dell'ago durante l'aspirazione del liquido, e si aspira il contenuto ruminale stando attenti a mantenere l'ago in posizione, per evitare che strisci con la punta la mucosa ruminale. Una volta prelevato il quantitativo di liquido ruminale necessario, si rimuove la siringa, si tappa il lume dell'ago con un dito e si rimuove l'ago stesso, mantenendo sempre una posizione perpendicolare alla parete del rumine per evitare di ferirne la mucosa o la parete.



Figura n.5. In questa sequenza di immagini si vedono: la disinfezione dell'area di centesi, il ballottamento con pugno chiuso e l'aspirazione del liquido ruminale.

Si è immediatamente misurato il pH del liquido ruminale prelevato, che è stato poi centrifugato, filtrato e conservato in provette eppendorf precedentemente sterilizzate, per la rilevazione dei lipopolisaccaridi (LPS). Il pH è stato rilevato tramite l'utilizzo di un pH-metro portatile (Piccolo; Hanna Instruments, Leighton Buzzard, Bedfordshire, UK), precedentemente calibrato secondo le istruzioni del produttore con una soluzione a pH 4 e una soluzione a pH 7. I valori rilevati sono stati organizzati in una scheda cartacea, indicando identificativo dell'animale, il valore di pH e l'orario del prelievo, e poi trascritti in un foglio Excel per la successiva valutazione. Dopo ogni singola misurazione, la sonda del pH-metro è stata accuratamente risciacquata con acqua distillata ed asciugata, per evitare contaminazione, ed è stato riposizionato il cappuccio protettivo.

4- PRELIEVI EMATICI

Sono stati eseguiti, per tutta la durata delle settimane di prova, due campionamenti ematici per animale alle ore 8:00 e alle ore 12:00.

Il prelievo è stato eseguito dalla vena giugulare, in quattro provette vacuteiner da 9 ml per prelievo: una contenente K3-EDTA, per l'esame emocromocitometrico (emocromo), e tre contenenti Litio-Eparina, una per l'emogasanalisi, una per le analisi del profilo biochimico ed una di riserva. I campioni per l'emogas analisi e per l'emocromo di tutti i giorni di prova sono stati consegnati refrigerati a 4°C all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie entro un'ora dal prelievo, e sono stati analizzati immediatamente. Le altre analisi sono state eseguite solo sui campioni di d2, d3 e d4. Un campione per le analisi biochimiche è stato immediatamente centrifugato in campo, e due aliquote di plasma surnatante sono state congelate a -20°.

4.1- Analisi dei parametri ematici

I campioni ematici sono stati analizzati in laboratorio presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. E' stata eseguita la conta cellulare col sistema Cell Dyn 3500 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA), per la valutazione dell'emocromo, e la misurazione dei seguenti parametri: conta dei globuli rossi (RBC), conta piastrinica (PLT), volume piastrinico medio (MPV), ed ematocrito (HCT); l'emogasanalisi è stata eseguita mediante il sistema Synthesis 15 (IL Instrumentation Laboratory SpA, Milano, Italy), per la valutazione dei seguenti parametri: pressione parziale di CO₂ (pCO₂), pressione parziale di O₂ (pO₂), concentrazione ematica di bicarbonato (HCO₃⁻), percentuale di emoglobina ossigenata (O₂Hb), percentuale di emoglobina ridotta (Rhb), saturazione misurata di ossigeno (sO₂m); con il sistema Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA) sono state valutate le concentrazioni di urea, glucosio, colesterolo (CHOL), acidi grassi non esterificati (NEFA), β-idrossibutirrato (BHB), aspartato aminotransferasi (AST), γ-glutamyl transferasi (γGT) e proteina legante le LPS (LBP).

5- ANALISI STATISTICA

La normalità della distribuzione dei campioni è stata analizzata utilizzando il test di Shapiro-Wilks, e le variabili che hanno dimostrato una $W < 0,95$ sono state convertite in logaritmi naturali per essere normalizzate. I valori riguardanti il pH ematico e ruminale, la conta cellulare, l'emogasanalisi, il profilo ematologico e il contenuto di LBP sono stati analizzati utilizzando una PROC MIXED. Il modello lineare comprende gli effetti fissi del trattamento alimentare, del periodo, del giorno di prova, dell'orario di prelievo, e delle loro interazioni, secondo la seguente equazione:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + P_j + D_k + h_l + TP_{ij} + TD_{ik} + PD_{jk} + TPD_{ijk} + \varepsilon_{ijklm}$$

in cui μ è la media stimata; T_i è l'effetto fissato del trattamento alimentare, in tre livelli: CT, MS E HS; P_j è l'effetto fissato del periodo, in tre livelli; D_k è l'effetto fissato dei giorni, con tre livelli: d1, d2 e d3, rispettivamente uno, due o tre giorni dopo il giorno di restrizione alimentare; h_l è l'effetto random delle manze (due manze per ogni T_i); TP_{ij} , TD_{ik} e PD_{jk} sono le interazioni tra i valori definiti; TPD_{ijk} è l'interazione tra dieta, periodo e giorno di prova; e ε_{ijklm} è il residuo random. Nel caso della DMI, i dati sono stati analizzati nello stesso modo, ma senza la variabile dell'orario e delle sue interazioni. Le quantità medie del tempo in cui ogni manza ha avuto un pH inferiore alle tre soglie prestabilite ($pH < 5,0$; $5,0 < pH < 5,5$; $5,5 < pH < 5,8$) non erano distribuite normalmente, quindi sono state analizzate con i criteri non parametrici di Kruskal-Wallis per discriminare tra i trattamenti alimentari. La significatività è stata definita con $P < 0,05$, anche se i dati sono stati considerati anche con valori di P compresi tra 0,05 e 0,10. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando SAS (2008, versione 9.2).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Innanzitutto, la salute delle sei manze non è risultata compromessa dalla prova, come confermato dal giudizio del Medico Veterinario che ne aveva valutato le condizioni anche all'inizio della sperimentazione.

Nell'intero periodo in cui sono stati seguiti gli animali, le bovine hanno mantenuto un incremento ponderale giornaliero di $0,75 \pm 0,09$ kg/d, ed hanno raggiunto un peso di $382 \pm 17,3$ kg.

L'ingestione di sostanza secca è stata influenzata dalla dieta (Tabella n.2) con un'ingestione maggiore in CT ed una minore in HS.

Tabella n.2. Effetto di trattamento, periodo e loro interazione sull'ingestione di sostanza secca (DMI).

	TRATTAMENTO ALIMENTARE ¹			PERIODO ²			P-value			SEM
	CT	MS	HS	1	2	3	T	P	T x P	
DMI, kg/d	7,7 ^a	6,9 ^a	5,1 ^b	6,2	6,6	6,9	0,002	0,426	0,571	0,39

¹ – CT: controllo; MS: dieta a medio contenuto di amido; HS: dieta ad elevato contenuto di amido.

² – periodi sperimentali.

^{a-b} – medie nella stessa riga con lettere differenti presentano una differenza significativa ($P < 0,05$).

La DMI è stata significativamente influenzata anche dal giorno D ($P < 0,001$), dall'interazione giorno x periodo P x D ($P = 0,011$) e dall'interazione trattamento x giorno x periodo T x D x P ($P = 0,008$)

La DMI è stata influenzata inoltre dal giorno (D) e dalle interazioni P x D e T x P x D, come indicato nelle didascalie della Tabella n.2 ed il picco minimo di assunzione di alimento si è verificato con la dieta HS, probabilmente a causa della riduzione del pH ruminale (Tabella n.4) ed in particolare durante il primo periodo, nel d2, il giorno successivo all'assunzione della HS. Ciò può essere spiegato come meccanismo di difesa messo in atto dalle bovine per ridurre gli effetti dell'acidosi, come già esposto da numerosi autori (Dijkstra *et al.*, 2012; Dohme, DeVries and Beauchemin, 2008; Enemark, 2008; Keunen *et al.*, 2002). Inoltre il fatto che l'ingestione di HS in d1 nel secondo periodo sia stata molto ridotta (Figura n.6) è dovuto ad un effetto memoria, soprattutto per le manze che già avevano sviluppato

l'acidosi acuta nel primo periodo a seguito dell'ingestione di MS (Figura n.6).

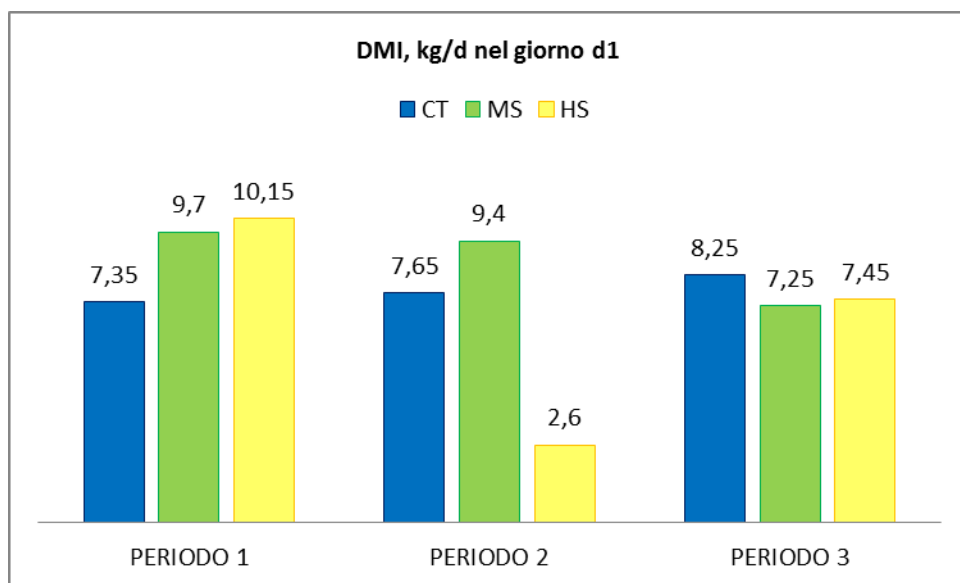


Figura n.6. DMI nel *challenge day* (d1).

CT: controllo; MS: dieta a medio contenuto di amido; HS: dieta ad elevato contenuto di amido.

Trattamento x periodo T x P ($P = 0,030$); SEM = 0,84.

Periodo 1, periodo 2, periodo 3: periodi sperimentali.

E' da tenere presente che la gravità dello stato di acidosi a cui ogni bovina è andata incontro è fortemente influenzata dalla sensibilità dell'individuo allo sviluppo di questo stato patologico. Ad ogni modo, gli animali su cui è stata condotta la prova non erano in produzione, ed erano soggetti giovani: le bovine in lattazione non riuscirebbero a ridurre così drasticamente l'ingestione senza andare incontro ad una fortissima lipomobilizzazione, aumentando il rischi di steatosi epatica. La dieta controllo, come atteso ha portato a valori di pH nadir e medio più elevati (Tabella n.4) e la HS ha fatto registrare invece i valori di pH nadir e medio più bassi. Per quanto riguarda l'effetto periodo, nel primo periodo sono stati registrati i valori più bassi di pH nadir, medio e massimo, rispetto ai valori riscontrati nel terzo periodo presumibilmente per un adattamento degli animali alle diete acidogene.

Tabella n.3. Valori massimi, medi e nadir del pH in base al trattamento alimentare ed al periodo.

pH	TRATTAMENTO ALIMENTARE ¹			PERIODO ²			P-value			SEM
	CT	MS	HS	1	2	3	T	P	T x P	
MAX	7,13	7,09	7,08	6,97 ^b	7,08 ^{ab}	7,25 ^a	0,423	0,001	0,054	0,090
MEDIA	6,50 ^a	6,34 ^b	6,31 ^b	6,15 ^b	6,48 ^a	6,52 ^a	0,012	0,001	0,116	0,076
NADIR	5,69 ^a	5,47 ^{ab}	5,44 ^b	5,23 ^b	5,75 ^a	5,62 ^a	0,042	0,003	0,307	0,073

¹ – CT: controllo; MS: dieta a medio contenuto di amido; HS: dieta ad elevato contenuto di amido.

² – periodi sperimentali.

^{a-b} – medie nella stessa riga con lettere differenti presentano una differenza significativa ($P < 0,05$).

Le manze che hanno assunto la dieta MS nel secondo periodo hanno subito un minor calo del pH rispetto a quelle che hanno assunto la stessa dieta nel primo periodo e hanno manifestato una minor riduzione dell' ingestione di HS nel terzo periodo. Questi due risultati, e la registrazione dei valori più bassi nel primo periodo di prova, sono presumibilmente tutti da ascrivere alla variazione di ingestione durante il *challenge day* (Tabella n.2) e ad una sorta di adattamento del rumine e dei soggetti alle diete acidogene. Esistono studi a favore di questa teoria, che affermano che *challenge* ripetuti portino ad un adattamento della mucosa e della flora ruminale, con riduzione del rischio e dell'entità dello stato acidotico (Nordlund, Garrett and Oetzel, 1995), e altri che affermano invece che *challenge* ripetuti causino un aumento della gravità dello stato di acidosi, pur contemporaneamente alla messa in atto da parte degli animali di meccanismi di difesa per evitare di sviluppare nuovamente l'acidosi (Dijkstra *et al.*, 2012; Kleen and Cannizzo, 2012; Dohme, DeVries and Beauchemin, 2008).

Per valutare il livello di acidosi a cui le manze sono andate incontro è stata determinata la quantità di tempo in cui per ogni animale è stato registrato un pH inferiore alle tre soglie stabilite in precedenza ($pH < 5,0$; $5,0 < pH < 5,5$; $5,5 < pH < 5,8$), come illustrato nella seguente figura.

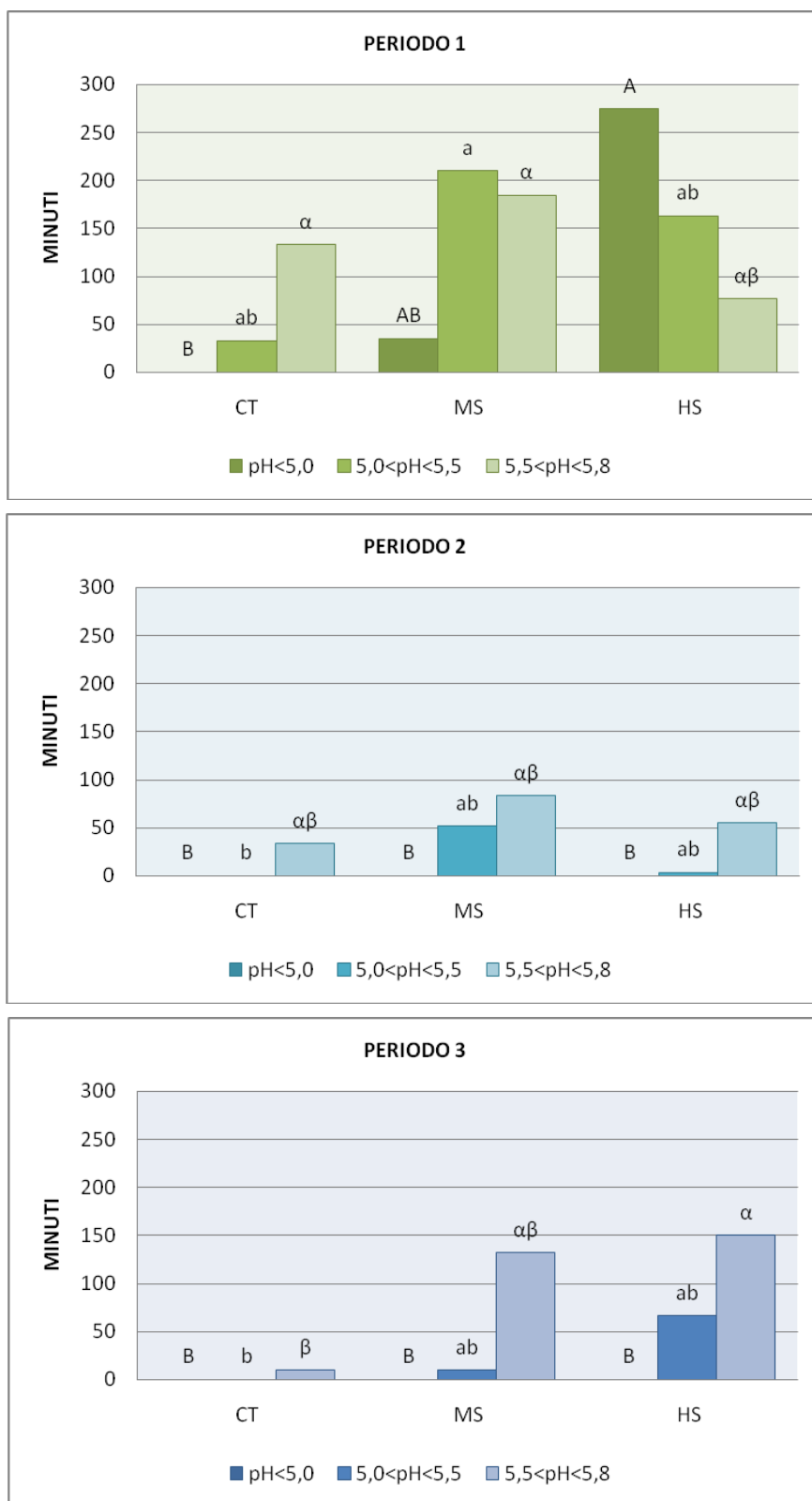


Figura n.7. Quantità media di tempo, al giorno, al di sotto delle tre soglie di pH nei tre periodi.

Soglie (pH < 5,0, 5,0 < pH < 5,5 e 5,5 < pH < 5,8) nei giorni d1-d2-d3, suddivise in base al trattamento alimentare (CT: controllo; MS: dieta a medio contenuto di amido; HS: dieta ad elevato contenuto di amido). I dati sono rappresentati come medie, e i valori di P associati sono indicati utilizzando il test non parametrico di Kruskal-Wallis. ^{A-B}: le medie giornaliere del tempo trascorso con valori di pH < 5,0 con simboli differenti sono statisticamente differenti ($P < 0.05$); ^{a-b}: le medie giornaliere del tempo trascorso con valori di pH < 5,0 con simboli differenti sono statisticamente differenti ($P < 0.05$); ^{α-β}: le medie giornaliere del tempo trascorso con valori di pH < 5,0 con simboli differenti sono statisticamente differenti ($P < 0.05$).

In particolare si può evidenziare come il pH sia sceso al di sotto della prima soglia, 5,0, durante il primo periodo per quegli animali a cui sono state somministrate le diete MS e HS, che quindi hanno sviluppato acidosi acuta; le manze alimentate nel primo periodo con la MS hanno inoltre mantenuto un pH tra 5,0 e 5,5 per un tempo più lungo, mentre le manze che nel primo periodo hanno mangiato la CT non hanno mai avuto un pH inferiore a 5,5 (Figura n.7).

Le grandi differenze tra le quantità di tempo in cui gli animali hanno avuto pH ruminali inferiori a 5,0 nei vari periodi sono dovute alle diverse DMI durante il *challenge day*, alla sensibilità individuale allo sviluppo di acidosi e presumibilmente all'effetto memoria negli animali che avevano precedentemente sviluppato acidosi.

Questi valori di pH sono quelli registrati dai boli, che hanno permesso una misurazione in continuo delle modificazioni ruminali durante tutti e tre i periodi di prova: i valori di pH rilevati con ruminocentesi, che forniscono solo un'istantanea della condizione endoruminale, sono stati utilizzati per verificare l'accuratezza delle misurazioni con questa metodica, ed è stata riscontrata una correlazione con coefficiente di regressione pari a 0,56 ($P = 0,040$), che indica una compatibilità tra i risultati ottenuti con le due metodiche. Di seguito sono riportati i dati dei due metodi di misurazione a confronto.

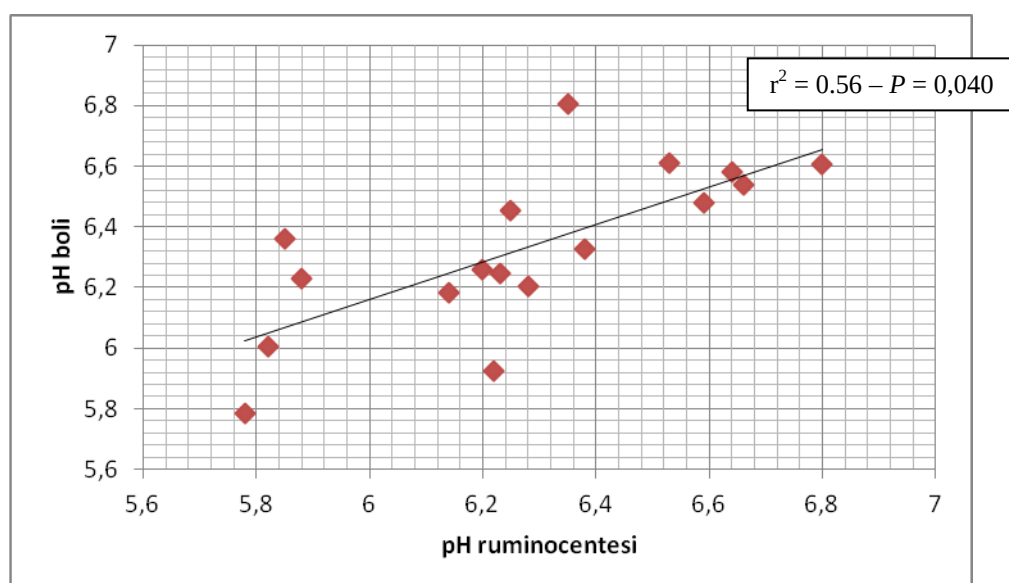


Figura n.8. Confronto tra le metodiche di rilevamento del pH ruminale: bolo endoruminale e ruminocentesi.

Per quanto riguarda i parametri ematici, in base alla dieta assegnata, nelle manze a cui è stata somministrata la dieta HS è stata riscontrata la maggiore concentrazione di emoglobina (HGB), ematocrito (HCT) e piastrine (PLT). L'aumento delle concentrazioni di HGB, HCT, e PLT è presumibilmente da associarsi all'emoconcentrazione conseguente al richiamo di liquidi a livello ruminale, per compensare l'aumento dell'osmolalità endoruminale e diluirne il contenuto acido (Owens *et al.*, 1998), ed è tanto più grande, quanto maggiore è la durata dello stato di acidosi nei vari soggetti. L'aumento della conta piastrinica potrebbe anche essere dovuto a lesioni micro- o macroscopiche a livello della mucosa ruminale, dovute al forte abbassamento del pH. (Steele *et al.*, 2009). Come riportato da Dong *et al.* (2011), la somministrazione di alte concentrazioni di substrati fermentescibili può portare ad un'iniziale sovraccrescita a livello ruminale della popolazione Gram-, la cui lisi, conseguente al calo del pH, causa la liberazione di grandi quantità di LPS all'interno del rumine e la relativa traslocazione attraverso la mucosa ruminale compromessa. L'entrata in circolo dell'endotossina causa una stimolazione del sistema immunitario che esita in un aumento delle LBP (Dong *et al.*, 2011).

Tabella n.4. Effetti del trattamento alimentare T e del periodo P sui parametri ematici.

	TRATTAMENTO ALIMENTARE			PERIODO			P-value			SEM
	CT	MS	HS	1	2	3	T	P	T x P	
HGB, g/Dl	11,1 ^{ab}	10,9 ^b	11,4 ^a	11,7 ^a	10,8 ^b	10,9 ^b	0,010	0,001	0,526	0,23
HCT, %	33,8 ^{ab}	32,8 ^b	34,1 ^a	35,4 ^a	32,3 ^b	33,0	0,027	<0,001	0,563	0,60
PLT, K/μl	506 ^b	481 ^b	601 ^a	493	564	530	0,008	0,177	0,043	78,4
MPV, fl	4,2	4,1	3,9	4,0	4,2	4,0	0,542	0,840	0,266	0,26
pCO₂, mmHg	52,0	50,3	50,4	50,4	50,9	51,4	0,126	0,502	0,137	0,63
pO₂, mmHg	61,7	72,3	71,1	42,1 ^b	71,4 ^{ab}	91,6 ^a	0,450	0,003	0,454	7,1
HCO₃⁻, mmol/L	31,8 ^a	31,3 ^{aβ}	30,6 ^{β}	31,8	31,3	30,7	0,071	0,127	0,081	0,45
O₂Hb, %	87,6	87,9	86,3	77,5 ^b	89,9 ^a	94,5 ^a	0,728	<0,001	0,683	2,01
RHb, %	9,9	9,8	12,4	20,4 ^a	8,6 ^b	3,1 ^b	0,381	<0,001	0,721	1,96
sO₂m, %	89,9	90,3	87,5	79,2 ^b	91,4 ^a	97,0 ^a	0,393	<0,001	0,715	2,12
Glucosio, mmol/L	4,34	4,37	4,32	4,42 ^a	4,26 ^{β}	4,35 ^{aβ}	0,686	0,098	0,891	0,104
CHOL, mmol/L	3,52	3,37	3,45	3,27 ^b	3,28 ^b	3,79	0,446	0,005	0,548	0,130
NEFA, meq/L	0,23	0,20	0,27	0,24	0,21	0,25	0,155	0,624	0,555	0,025
BHB, mmol/L	0,28	0,31	0,29	0,26 ^{β}	0,30 ^{aβ}	0,31 ^a	0,440	0,069	0,406	0,016
AST, U/L	78,2 ^{ab}	72,1 ^b	82,0 ^a	76,1 ^{aβ}	74,4 ^{β}	81,7 ^a	0,007	0,053	0,092	1,7
γGT, U/L	19,2	19,4	18,6	17,7 ^b	19,2 ^{ab}	20,4 ^a	0,527	0,031	0,622	1,33
LBP, μg/mL	5,9 ^b	9,5 ^a	10,5 ^a	10,5 ^a	7,4 ^b	7,9 ^b	<0,001	0,014	0,221	0,92

¹ – CT: controllo; MS: dieta a medio contenuto di amido; HS: dieta ad elevato contenuto di amido.

² – periodi sperimentali.

^{a-b} – medie nella stessa riga con lettere differenti presentano una differenza significativa ($P < 0,05$).

^{a- β} – medie nella stessa riga con lettere differenti presentano una differenza significativa ($P < 0,10$).

Nelle analisi relative ai soggetti alimentati con la HS è stata riscontrata anche la concentrazione minore di HCO₃⁻, dovuta all'impiego del bicarbonato ematico come *buffer* per ridurre gli effetti dello stato di acidosi ruminale (sia a livello endoruminale, sia a livello ematico, per l'entrata in circolo di VFA) (Dijkstra *et al.*, 2012).

Sono state registrate inoltre differenze tra periodi per i seguenti parametri (Tabella n.4) che hanno mostrato valori minimi nel primo periodo, caratterizzato da pH

ruminali inferiori: pressione parziale di ossigeno (pO_2), percentuale di emoglobina ossigenata (O_2Hb), saturazione misurata di ossigeno (sO_2m). Durante l'acidosi ruminale infatti, l'assorbimento degli acidi organici accumulatisi nel rumine, rischia di sopraffare l'effetto tampone dell' HCO_3^- ematico aumentando il rischio di insorgenza dell'acidosi metabolica (González *et al.*, 2012). Alla diminuzione dell' HCO_3^- e per impedire la diminuzione del pH ematico, si attiva un sistema tampone cellulare che porta ad uno *shift* nella curva di dissociazione dell'ossiemoglobina e ad un più veloce rilascio di ossigeno dai globuli rossi ai tessuti, incrementando quindi l'emoglobina ridotta (RHb) e diminuendo le concentrazioni di O_2Hb , pO_2 e sO_2m , come riportato da Jones (2010) per l'uomo.

In questa prova è stato registrato un leggero aumento della pressione parziale di O_2 (pO_2) nei soggetti alimentati con dieta HS, ma non è risultato statisticamente significativo.

E' stato evidenziato un aumento significativo della concentrazione ematica della proteina legante il LPS (LBP), che ha raggiunto le concentrazioni maggiori negli animali a cui è stata somministrata la HS rispetto a quelli a cui è stata somministrata la CT (10,5, 9,5 e 5,9 $\mu g/ml$ con dieta HS, MS e CT, rispettivamente); allo stesso tempo, le concentrazioni medie di LBP sono calate dal primo al terzo periodo (da 10,5 $\mu g/ml$ nel primo periodo, a 7,9 $\mu g/ml$ nel terzo), in accordo col minor grado di acidosi raggiunta nel terzo periodo. Si potrebbe inoltre supporre un adattamento della mucosa ruminale alla stimolazione acida, con una maggiore efficienza della sua funzione di barriera nel primo periodo rispetto al primo, che conseguirebbe in una minore traslocazione in circolo del LPS (Plaizier *et al.*, 2012).

Come già descritto per l'emogas analisi, il periodo ha esercitato una notevole influenza anche su altri parametri ematici: infatti, nel primo periodo si sono registrati i minori valori di pH e contemporaneamente le maggiori concentrazioni di LBP; inoltre, si è verificato un leggero aumento della concentrazione ematica del glucosio, che si può probabilmente spiegare con la maggiore disponibilità di amidi presente nelle diete acidogene, che può aver portato ad un aumento dell'assorbimento intestinale di glucosio. Allo stesso tempo, è evidenziabile un seppur lieve calo del BHB, presumibilmente dovuto alla medesima ragione.

E' stato evidenziato inoltre un aumento dei valori di AST per la dieta HS e sono

state riscontrate le concentrazioni maggiori di AST e γ GT nel terzo periodo.: essendo entrambi enzimi indicatori aspecifici di danno epatico, il loro aumento è probabilmente da ritenersi dovuto allo stress che il fegato può aver subito sia per la stimolazione immunitaria generalizzata (le proteine infiammatorie sono sintetizzate a livello epatico) (Danscher *et al.*, 2011), sia per i cambiamenti alimentari imposti dalla sperimentazione.

CONCLUSIONI

L'acidosi ruminale, nonostante i numerosi studi condotti ad oggi, rimane una patologia con numerosi aspetti ancora oscuri. Il suo coinvolgimento nello sviluppo di altri processi patologici è riconosciuto ma tuttora non dimostrato, e le metodiche per una diagnosi rapida e precoce in campo sono ancora in fase di studio.

La valutazione delle variabili ematiche, sia per quanto riguarda le emogasanalisi, sia per quanto riguarda il profilo infiammatorio, possono rivelarsi utili alleati per un monitoraggio di routine dell'allevamento, fornendo un'indicazione di sospetto qualora ci siano variazioni dei parametri ematici quali RBC, WBC, HCT, PLT, pCO_2 , HCO_3^- , O_2Hb , sO_2m , e LBP.

Le metodiche diagnostiche in campo vanno necessariamente affinate, ed è opportuno continuare a ricercare il sistema più vantaggioso ed accurato per il monitoraggio della salute degli animali.

Ad ogni modo, visto che il periodo di maggior rischio di sviluppare acidosi è il periodo di transizione, è necessario considerare che questa condizione può essere, più che un problema della mandria di per sé, un segnale della presenza di qualche squilibrio nella gestione della mandria: non è consigliabile infatti focalizzarsi su patologie la cui patogenesi non è ancora ben definita, nel cui sviluppo si presume che l'acidosi abbia un ruolo, ma è necessario prestare attenzione agli equilibri fisiologici della bovina, per garantirne la salute e massimizzare la produzione.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Annison F., Browning G., Cusack P., Farquharson B., Lean I.J., Little S., Nandapi D., 2007. Ruminal Acidosis – understandings, prevention and treatment. A review for veterinarians and nutritional professionals. *feed.FIBRE.future*. p. 7-43.

Beauchemin K., Yang W.Z., Morgavi D.P., Ghorbani G.R., Kautz W., Leedle J.A.Z., 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 81, 1628-1640.

Bittante G., Andrighetto I., Ramanzin M., 2005. Tecniche di produzione animale. *Liviana, Novara*. 23-71.

Calsamiglia S., Blanch M., Ferret A., Moya D., 2012. Is subacute ruminal acidosis a pH related problem? Causes and tools for its control. *Animal Feed Science and Technology*. 172, 42-50.

Coetzee G.A., Strachan A.F., van der Westhuyzen D.R., Hoppe H.C., Jeenah M.S., de Beer F.C., 1986. Serum amyloid-A containing human high density lipoprotein 3. Density, size, and apolipoprotein composition. *Journal of Biological Chemistry*. 261, 9644-9651.

Colman E., Fokkink W.B., Craninx M., Newbold J.R., De Baets B., Fievez V., 2010. Effect of induction of subacute ruminal acidosis on milk fat profile and rumen parameters. *Journal of Dairy Science*. 93, 4759-4773.

Conner J.G., Eckersall P.D., Ferguson J., Douglas T.A., 1988. The acute phase response in the dog following surgical trauma. *Research in Veterinary Science*. 45, 107-110.

Dansch A.M., Thoefner M.B., Heegaard P.M.H., Ekstrøm C.T., Jacobsen S., 2011. Acute phase protein response during acute ruminal acidosis in cattle. *Livestock Science*. 135, 62-69.

Dehkordi A.J., Dehkordi Z.K., 2011. Occurrence of metabolic alkalosis in rumen lactic acidosis: a review article. *Comparative Clinical Pathology*. 20, 1-3.

Dijkstra J., Ellis J.L., Kebreab E., Strathe A.B., López S., France J., Bannink A., 2012. Ruminal pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Animal Feed Science and Technology*. 172, 22-33.

Dohme F., DeVries T.J., Beauchemin K.A., 2008. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: ruminal pH. *Journal of Dairy Science*. 91, 3554-3567.

Dong G., Liu S., Wu Y., Lei C., Zhou J., Zhang S., 2011. Diet-induced bacterial immunogens in the gastrointestinal tract of dairy cows: impacts on immunity and metabolism. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 53, 48.

Duffield T., Plaizier J.C., Fairfield A., Bagg R., Vessie G., Dick P., Wilson J., Aramini J., McBride B.W., 2004. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 87, 59-66.

Enemark J.M.D., 2008. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): a review. *Veterinary Journal*. 176, 32-43.

Esposito G., Irons P.C., Webb E.C., Chapwanya A., 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition cows. *Animal Reproduction Science*. 144, 60-71.

Fantinati P., 2008. Acidosi sub acuta una patologia silente. *Dossier Alimentazione Vacca da Latte, AQ*.

Freeden A.H., DePeters E.J., Baldwin R.L., 1988. Characterization of acid-base disturbances and effects on calcium and phosphorus balances of dietary fixed ions in pregnant or lactating does. *Journal of Animal Science*. 68, 159-173.

Garrett E.F., Pereira M.N., Nordlund K.V., Armentano L.E., Goodger W.J., Oetzel G.R., 1999. Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 82, 1170-1178.

Gasteiner J., Guggenberger T., Häusler J., Steinwidder A., 2012. Continuous and long-term measurement of reticuloruminal pH in grazing dairy cows by an indwelling and wireless data transmitting unit. *Veterinary Medicine International*. 2012:236956

Ghorbani G.R., Morgavi D.P., Beauchemin K., Leedle J.A.Z., 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 80, 1977-1985.

Gianesella M., 2013. Acidosi ruminale subacuta nella vacca da latte. <http://www.ruminantia.it/acidosi-ruminale-subacuta-nella-vacca-da-latte/>

Gianesella M., Morgante M., Cannizzo C., Stefani A., Dalvit P., Messina V., Giudice E., 2010. Subacute ruminal acidosis and evaluation of blood gas analysis in dairy cow. *Veterinary Medicine International*. 2010:392371

Goff J.P., Horst R.L., 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science*. 80, 1260-1268.

Gozho G.N., Krause D.O., Plaizier J.C., 2007. Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 90, 856-866.

Horadagoda N.U., Knox K.M.G., Gibbs H.A., 1999. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Veterinary Record*. 144, 437-441.

Jacobsen S., Andersen P.H., Toelboell T., Heegaard P.M.H., 2004. Dose dependency and individual variability of the lipopolysaccharide-induced bovine acute phase protein response. *Journal of Dairy Science*. 87, 3330-3339.

- Jones M.B., 2010. Basic interpretation of metabolic acidosis. *Critical Care Nurse*. 30, 63-69.
- Keunen J.E., Plaizier J.C., Kyriazakis I., Duffield T.F., Widowski T.M., Lindinger M.I., McBride B.W., 2002. Effects of a subacute ruminal acidosis model on the diet selection of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 85, 3304-3313.
- Kim I.-H., Suh G.-H., 2003. Effect of the amount of body condition loss from the dry to near calving periods on the subsequent body condition change, occurrence of postpartum diseases, metabolic parameters and reproductive performance in Holstein dairy cows. *Theriogenology*. 60, 1445-1456.
- Kimura A., Sato S., Kato T., Ikuta K., Yamagashi N., Okada K., Mizuguchi H., Ito K., 2012. Relationship between pH and temperature in the ruminal fluid of cows, based on a radio-transmission pH-measurement system. *Journal of Veterinary Medical Science*. 74, 1023-1028.
- Kleen J.L., Cannizzo C., 2012. Incidence, prevalence and impact of SARA in dairy herds. *Animal Feed Science and Technology*. 172, 4-8.
- Kleen J.L., Hooijer G.A., Rehage J., Noordhuizen J.P., 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *Journal of Veterinary Medicine. A: Physiology, Pathology, Clinical medicine* 50, 406-414.
- Kleen J.L., Hooijer G.A., Rehage J., Noordhuizen J.P., 2004. Rumenocentesis (rumen puncture): a viable instrument in herd health diagnosis. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 111, 458-462.
- Krause K.M., Oetzel G.R., 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 126, 215-236.
- Maekawa M., Beauchemin K.A., Christensen D.A., 2002. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production and ruminal pH of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 85, 1165-1175.
- Morgante M., Stelletta C., Berzaghi P., Ganesella M., Andrighetto I., 2007. Subacute rumen acidosis in lactating cows: an investigation in intensive italian dairy herds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 91, 226-34.
- Nakagawa H., Yamamoto O., Oikawa S., Higuchi H., Watanabe A., Katoh N., 1997. Detection of serum haptoglobin by enzyme-linked immunosorbent assay in cows with fatty liver. *Research in Veterinary Science*. 62, 137-141.
- National Research Council (NRC), 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. *Washington, DC, National Academic Press*.
- Nocek J.E., 1997. Bovine acidosis: implications on laminitis. *Journal of Dairy Science*. 80, 1005-1028.

Nordlund K.V., Garrett E.F., 1994. Rumenocentesis – a technique for collecting rumen fluid for the diagnosis of subacute rumen acidosis in dairy herds. *The Bovine Practitioner*. 28, 109-112.

Nordlund K.V., Garrett E.F., Oetzel G.R., 1995. Herd-based rumenocentesis: a clinical approach to the diagnosis of subacute rumen acidosis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 17, 48-56.

O’Grady L., Doherty M.L., Mulligan F.J., 2008. Subacute ruminal acidosis (SARA) in grazing irish dairy cows. *Veterinary Journal*. 176, 44-49.

Oetzel G.R., 2000. Clinical aspects of ruminal acidosis in dairy cattle. *Proceedings of the 33rd Annual Convention of the American Association of Bovine Practitioner, Rapid City*. p. 46-53.

Owens F.N., Secrist D.S., Hill W.J., Gill D.R., 1998. Acidosis in cattle – a review. *Journal of Animal Science*. 76, 275-286.

Penner G.B., Beauchemin K.A, Mutsvangwa T, 2006. An evaluation of the accuracy and precision of a stand-alone submersible continuous ruminal pH measurement system. *Journal of Dairy Science*. 89, 2132-2140.

Plaizier J.C., Khafipour E., Li S., Gozho G.N., Krause D.O., 2012. Subacute ruminal acidosis (SARA), endotoxins and health consequences. *Animal Feed Science and Technology*. 172, 9-21.

Plaizier J.C., Krause D.O., Gozho G.N., McBride B.W., 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *Veterinary Journal*. 176, 21-36.

Sato S., Ikeda A., Tsuchiya Y., Ikuta K., Murayama I., Kanehira M., Okada K., Mizuguchi H., 2012. Diagnosis of Subacute Ruminal Acidosis (SARA) by Continuous Reticular pH Measurements in Cows. *Veterinary Research Communications*. 36, 201–205.

Sato S., Kimura A., Anan T., Yamagishi N., Okada K., Mizuguchi H., Ito K., 2012. A radio transmission pH measurement system for continuous evaluation of fluid pH in the rumen of cows. *Veterinary Research Communications*. 36, 85-89.

Sato S., Mizuguchi H., Ito K., Ikuta K., Kimura A., Okada K., 2012. Technical note: development and testing of a radio transmission pH measurement system for continuous monitoring of ruminal pH in cows. *Preventive Veterinary Medicine*. 103, 274-279.

Steele M.A., AlZahal O., Hook S.E., Croom J., McBride B.W., 2009. Ruminal acidosis and the rapid onset of ruminal parakeratosis in a mature dairy cow: a case report. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 51, 39.

Stone W.C., 2004. Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 87, 13-26.

Stone, W.C., 1999. The effect of subclinical rumen acidosis on milk components. *Proceedings Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, Cornell University, Ithaca, NY, USA*. 40–46.

Van Knegsel A.T.M., van der Brand H., Dijkstra J., Kemp B., 2007. Effects of dietary energy source on energy balance, metabolites and reproduction variables in dairy cows in early lactation. *Theriogenology*. 68, 274-280.

Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74, 3583-3597.

Ward W.R, 2009. Why is lameness in dairy cows so intractable? *Veterinary Journal*. 180, 139-140.

Zebeli Q., Mansmann D., Steingass H., Ametaj B.N., 2010. Balancing diets for physically effective fibre and ruminally degradable starch: a key to lower the risk of sub-acute rumen acidosis and improve productivity of dairy cattle. *Livestock Science*. 127, 1-10.