

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

Corso di laurea a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

**Periodo di transizione nella bovina da latte:
correlazione tra ecografie epatiche e parametri
metabolici**

Relatore:

Prof. Matteo Giancesella

Correlatori:

Prof. Enrico Fiore

Dott.ssa Anastasia Lisuzzo

Laureanda:

Silvia Bordin

Matricola n. 1187395

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

Riassunto	1
Abstract	3
1. Introduzione.....	5
1.1 Il periodo di transizione ed il suo assetto metabolico	5
1.1.1 Body condition score (BCS)	6
1.1.2 Mobilizzazione delle riserve corporee	8
1.1.3 Regolazione della glicemia	10
1.1.4 Funzionalità epatica.....	11
1.1.5 Stress metabolico, stress ossidativo e immunosoppressione	13
1.2 Patologie epatiche del periodo di transizione	14
1.2.1 Chetosi.....	15
1.2.2 Lipidosi.....	19
1.3 Ecografia epatica durante il periodo di transizione.....	23
1.3.1 Funzionamento dell'ecografia	23
1.3.2 Principali artefatti ecografici	26
1.3.3. Ecografia del fegato: modalità e valenza clinico-diagnostica	28
2. Obiettivi della tesi.....	33
3. Materiali e metodi.....	34
3.1 Disegno sperimentale	34
3.1.1 Campionamento ematico ed analisi biochimica	34
3.1.2 Indagine ecografica	35
3.2 Suddivisione degli animali in gruppi	37
3.3 Analisi statistica	38
4. Risultati	39
5. Discussione.....	43
5.1 Associazione tra parametri metabolici e stato di salute del fegato	43
5.2 Associazione tra indagine ecografica e stato di salute del fegato.....	47
6. Conclusioni.....	50
7. Bibliografia.....	51

Acronimi ed abbreviazioni

ALT: Alanina aminotransferasi

AST: Aspartato aminotransferasi

BCS: Body Condition Score

BHB: β -idrossibutirrato

BIL.T.: Bilirubina totale

DIM: Days In Milk

DL: Profondità del fegato

DMI: Dry Matter Intake

DPV: Profondità della vena porta

GGT: γ -glutamyl-transferasi

GR1: Gruppo 1 (sano)

GR2: Gruppo 2 (sospetto danneggiamento epatico)

GR3: Gruppo 3 (lipomobilizzazione)

GR4: Gruppo 4 (sospetta lipidosi epatica)

NEB: Bilancio energetico negativo

NEFA: Acidi grassi non esterificati

PVA: Area della vena porta

PVD: Diametro della vena porta

TAG: Contenuto epatico di trigliceridi

Riassunto

La chetosi e la lipidosi sono le principali patologie epatiche del periodo di transizione della bovina da latte, e costituiscono un problema non solo per la funzionalità del fegato stesso, ma anche per le ripercussioni che possono avere sull'intero organismo, soprattutto per quanto riguarda il sistema riproduttivo ed immunitario. L'obiettivo principale di questa tesi è stato comparare l'analisi biochimica relativa ai principali parametri ematici del periodo di transizione con i risultati dell'indagine ecografica epatica per confermare l'eventuale attendibilità di quest'ultima come metodo di monitoraggio e diagnosi di lipidosi nella bovina da latte.

La prova è stata condotta reclutando 69 bovine di razza Frisona Italiana provenienti da 6 aziende e valutate in tre tempistiche: 7 ± 3 giorni preparto (T0), 7 ± 3 giorni post-partum (T1), 21 ± 3 giorni post-partum (T2). Per ogni animale e tempistica sono stati eseguiti: la valutazione del BCS; un esame biochimico per la valutazione di NEFA, BHB, AST e BIL.T.; un esame ecografico trans-addominale del fegato per la valutazione della texture epatica e specifiche misurazioni (PVD, PVA, DPV, DL). Sulla base dei valori di NEFA e AST riscontrati a T1 le bovine sono state successivamente suddivise in 4 gruppi: GR1 (sano, $n=25$, NEFA <0.57 mEq/L; AST <100 UI/L), GR2 (sospetto danno epatico, $n=21$, NEFA <0.57 mEq/L; AST >100 UI/L), GR3 (lipomobilizzazione, $n=5$, NEFA >0.57 mEq/L; AST <100 UI/L), GR4 (sospetta lipidosi, $n=18$, NEFA >0.57 mEq/L; AST >100 UI/L). L'analisi statistica è stata svolta secondo un'ANOVA a due vie con modello statistico misto, utilizzando come effetti fissi il gruppo, il tempo e la loro interazione, e come effetti randomici e ripetuti gli animali e le aziende.

Tutti i gruppi hanno manifestato un aumento dei valori di NEFA, BHB e AST nel passaggio da T0 a T1, come effetto della mobilizzazione delle riserve corporee che avviene in maniera fisiologica nella bovina da latte durante la transizione. Oltre a questi parametri, GR2 presentava valori più elevati di AST, PVD e PVA rispetto a GR1, compatibili con un danneggiamento epatico. GR3 presentava valori più elevati di PVD, DPV e DL, associati ad una diminuzione di TAG a T1; questi risultati possono essere indicativi di una intensa lipomobilizzazione avvenuta durante il periodo di transizione. GR4 presentava valori di parametri metabolici ed ecografici maggiori rispetto agli altri gruppi, ed indicativi di chetosi subclinica e lipidosi epatica.

Ulteriori studi sono necessari per ampliare le attuali conoscenze relative alle variazioni fisiologiche dei parametri metabolici ed ecografici durante il periodo di transizione, e per determinare l'attendibilità dell'esame ecografico epatico, possibilmente associato all'esame biochimico, per il monitoraggio della lipidosi.

Abstract

Ketosis and fatty liver syndrome, or hepatic lipidosis, are the main hepatic transition period disorders in dairy cows, challenging not only for the liver's function, but also for the possible repercussions these conditions have on the entire organism, especially on the reproductive and immune systems.

The aim of this study was to compare the main biochemical parameters of the transition period with the hepatic ultrasonography measurements and liver lipid content to assess this technique as a screening and diagnostic method for hepatic lipidosis during the transition period of dairy cows.

A total of 69 Holstein-Friesian dairy cows from 6 farms were enrolled in this study and evaluated in three time points: 7 ± 3 days before the expected calving date (T0), 7 ± 3 days post-partum (T1), 21 ± 3 days post-partum (T2). A BCS evaluation, a blood sampling for the biochemistry assessment and a hepatic ultrasonography (US) examination were carried out for each animal and time point. Based on the US, the liver lipid content and the main measurements (PVD, PVA, DPV, DL) were assessed. According to NEFA and AST values found in T1, the animals were divided into 4 groups: GR1 (healthy, $n=25$, NEFA <0.57 mEq/L; AST <100 UI/L), GR2 (possible hepatic damage, $n=21$, NEFA <0.57 mEq/L; AST >100 UI/L), GR3 (lipomobilization, $n=5$, NEFA >0.57 mEq/L; AST <100 UI/L), GR4 (possible fatty liver, $n=18$, NEFA >0.57 mEq/L; AST >100 UI/L). The statistical analysis was performed with a mixed model considering group, time and their interaction as fixed effects, and animals and farms as random and repeated effects.

All 4 groups showed an increase in NEFA, BHB and AST values from T0 to T1. This is an effect of the lipomobilization that occurs para-physiologically in dairy cows during the transition period. In addition, GR2 showed higher values of AST, PVD and PVA in respect to GR1, compatible with hepatic damage. GR3 showed higher values of PVD, DPV and DL, associated with a reduced value of TAG in T1; these results could be suggestive of an intense lipomobilization occurred during the transition period. GR4 showed higher values of both metabolic and ultrasonographic parameters, highly suggestive of subclinical ketosis and hepatic lipidosis.

Further investigation is necessary to expand the actual knowledge regarding the para-physiological variations of metabolic and ultrasonographic parameters during the transition, and to determine the accuracy of liver US and its possible association with blood biochemistry for the detection of hepatic lipidosis in dairy cows.

1. Introduzione

1.1 Il periodo di transizione ed il suo assetto metabolico

Il periodo di transizione nella bovina da latte viene comunemente definito come il periodo di tempo che intercorre dalle tre settimane che precedono il parto alle tre settimane post-partum (Grummer, 1995; Drackley, 1999). Nell'arco temporale che precede il parto, la crescita fetale ed i relativi requisiti in termini di nutrienti ed energia raggiungono il loro massimo. Contemporaneamente, l'ingestione volontaria di alimento da parte dell'animale si riduce anche a causa del volume occupato dal feto e dall'utero fortemente aumentato di dimensioni all'interno dell'addome (Bell, 1995).

Dal momento del parto in poi le bovine sono sottoposte ad un cambio improvviso di dieta con il passaggio da un'alimentazione basata prevalentemente su foraggi, caratteristica dell'asciutta, ad un'alimentazione molto ricca in concentrati, per supportare la lattazione. Nonostante ciò, subito dopo il parto l'ingestione alimentare della bovina non è in grado di adeguarsi alle elevate esigenze energetiche necessarie per la galattopoiesi. La bovina entra quindi in una condizione di bilancio energetico negativo (Negative Energy Balance, NEB), che esita nella mobilitazione delle riserve corporee, in particolare del tessuto adiposo, anche quando l'ingestione volontaria dell'alimento tende in seguito ad aumentare (Weber et al., 2013). Tale mobilitazione rappresenta sostanzialmente un tentativo di compensazione da parte della bovina, ed è fondamentale per supportare la produzione di latte che cresce rapidamente, eccedendo l'energia che viene introdotta grazie all'alimento (Bertoni et al., 2008). Altri fattori, come lo stress o un errato management aziendale della mandria, possono ulteriormente ridurre l'ingestione di sostanza secca (Dry Matter Intake, DMI) da parte dell'animale, peggiorando il NEB (Esposito et al., 2014).

Quasi tutte le bovine da latte ad alta produzione si trovano in questa condizione nel periodo immediatamente successivo al parto, per tre principali cause: l'aumento dei fabbisogni energetici nel momento del parto, il calo dell'ingestione che avviene nel periodo immediatamente precedente il parto, il DMI che non raggiunge sufficientemente le esigenze energetiche richieste per la produzione di latte (Hayirli et al., 2002). L'imposizione di diversi fattori metabolici stressanti rappresenta una sfida per il mantenimento dell'omeostasi dell'animale, e contribuisce a rendere la fase di transizione un periodo critico (Goff and Horst, 1997).

Un certo grado di bilancio energetico negativo è considerato para-fisiologico durante il periodo post-partum (Ospina et al., 2010). Se eccessivo, tuttavia, esso è considerato dannoso per la salute e la produttività dell'animale, anche a causa delle patologie che possono insorgere in questa fase e del

sospetto legame tra carenza di energia ed immunosoppressione. È ormai noto, infatti, come in una condizione di NEB la bovina sia soggetta ad un certo grado di stress ossidativo e il suo sistema immunitario risulti indebolito, rendendo quindi l'animale più suscettibile ad infezioni (Sordillo and Raphael, 2013; Lacasse et al., 2018). La durata e la gravità del NEB sono correlate ad una serie di fattori: merito genetico della bovina, body condition score (BCS), produzione di latte, ingestione alimentare e tipologia di dieta (Rousing et al., 2020). La gravità del NEB nella prima fase di lattazione e il tasso di ripresa della bovina da questa condizione sono criticamente importanti per la sua salute e produttività. Nonostante le scelte manageriali siano fondamentali in quanto influenzano il BCS e la tipologia della dieta, vi sono comunque delle variazioni individuali legate al merito genetico degli animali all'interno della mandria che influiscono sulla loro risposta alla transizione: alcuni animali sono in grado di fronteggiare i cambiamenti metabolici in maniera più efficiente rispetto ad altri, che svilupperanno invece patologie. Ciò significa che il management aziendale e i fattori ambientali non sono sempre considerabili determinanti (Kessel et al., 2008).

L'intero periodo di transizione è caratterizzato da cambiamenti nutrizionali, metabolici, ormonali ed immunologici che hanno un impatto sull'incidenza delle patologie di natura infettiva e metabolica (Lacasse et al., 2018). I cambiamenti endocrini che avvengono durante questa fase sono molto più imponenti rispetto a qualunque altra fase del ciclo gestazione-lattazione della bovina da latte (Grummer, 1995). Il modo in cui questi cambiamenti avvengono, come vengono rilevati e diagnosticati è estremamente importante, in quanto essi sono strettamente correlati a patologie cliniche e subcliniche del periodo post-partum, alla lattazione e alle performances riproduttive: tutti fattori che hanno un ruolo significativo per il profitto dell'azienda (Puppel and Kuczyńska, 2016). Essenzialmente, quasi tutte le bovine vanno incontro a questi fenomeni nel periodo peri-parto: riduzione dell'ingestione alimentare, NEB, perdita di peso nella prima fase di lattazione, lipolisi, fase di insulino-resistenza, ipocalcemia nei giorni che seguono il parto, ridotta funzionalità immunitaria nell'intero periodo di transizione, contaminazione batterica dell'utero nelle due o tre settimane successive al parto (LeBlanc, 2010).

1.1.1 Body condition score (BCS)

Il Body Condition Score (BCS) di una bovina è una valutazione della proporzione di grasso corporeo dell'animale (Roche et al., 2009). È un sistema che permette di dare una certa oggettività alla determinazione dello stato nutrizionale. Si esegue attraverso l'osservazione e la palpazione della regione dorsale lombare, dei processi trasversi delle vertebre lombari e dell'attaccatura della coda (Peek and Divers, 2018). Esistono diversi sistemi di misurazione del BCS: negli Stati Uniti e in

Europa si usa prevalentemente la scala a 5 punti (da 1 a 5), con scatti di 0.25; in Australia si usa una scala a 8 punti, mentre in Nuova Zelanda si usa una scala a 10 punti (Ferguson et al., 1994; Roche et al., 2004; Puppel and Kuczyńska, 2016). Indipendentemente dalla scala utilizzata, punteggi bassi di BCS riflettono bovine con scarse riserve di tessuto adiposo, mentre punteggi elevati rappresentano bovine con grandi riserve di tale tessuto (over-conditioned cows).

Le variazioni in termini di BCS rilevate durante il periodo di transizione possono essere utilizzate per comprendere come la bovina mobilizza le sue riserve corporee (Roche et al., 2009). Idealmente il BCS andrebbe valutato alla messa in asciutta, al parto, al picco di lattazione, tra i 70 e i 90 giorni di lattazione, e ulteriormente intorno alla metà della lattazione (Caixeta and Omontese, 2021).

Elevati valori di BCS al parto si associano ad una sua maggiore perdita nella prima parte della lattazione. Un BCS pari a 3-3.25 su 5 al parto, invece, permette di massimizzare la produzione di latte successiva e diminuisce il rischio di patologie metaboliche ed infettive. Vi è un consensus comune sul fatto che il DMI di una bovina sia influenzato dal BCS che l'animale presenta al parto e durante la prima fase di lattazione. Nonostante questi meccanismi non siano ancora del tutto chiari, è comunemente riconosciuto che il BCS della bovina è negativamente associato all'ingestione di sostanza secca: bovine con un BCS pari a massimo 3.25 su 5 al parto raggiungono il loro massimo DMI in un tempo minore rispetto a bovine con un BCS più elevato (Rupprechter et al., 2018).

Durante la prima fase di lattazione ci si aspetta una piccola perdita di BCS come effetto del NEB (Rousing et al., 2020): comunemente le bovine da latte perdono 0.5-1 su 5 punti di BCS tra il parto e il picco di lattazione. Perdite superiori a 1 su 5 punti devono essere evitate in quanto sono associate a scarse performances riproduttive successive (Caixeta and Omontese, 2021). Infatti, bovine con scarsi valori di BCS a 7-10 settimane post-partum hanno un intervallo parto-concepimento maggiore (Wathes et al., 2007).

Vi è quindi una relazione tra BCS, stato metabolico dell'animale, funzionalità epatica e riproduttiva (Zebeli et al., 2015; D'Occhio et al., 2019). Un BCS non adeguato al parto e durante la prima fase di lattazione è associato ad una serie di disordini metabolici, in particolare chetosi, ipocalcemia, dislocazione abomasale e lipidosi epatica (Roche et al., 2009). Vacche con un BCS uguale o maggiore di 3.75 su 5, ad esempio, hanno un rischio maggiore di sviluppare chetosi clinica o dislocazione abomasale (Dechow et al., 2004; Seifi et al., 2011).

Alcuni studi hanno dimostrato come un valore elevato di BCS (over-conditioning) in bovine né gravide né in lattazione possa modificare l'espressione di alcune proteine che regolano il metabolismo del tessuto adiposo, oltre ad alterare la sensibilità dei tessuti all'insulina (Locher et al., 2015). Una situazione di over-conditioning deriva di solito da una dieta sbilanciata somministrata

alle bovine prima del parto (Ingvarsen et al., 2003). Nell'uomo l'obesità è associata ad insulino-resistenza, con una minore risposta del tessuto adiposo agli effetti modulatori dell'insulina (Ye, 2013). Di conseguenza l'obesità potrebbe esacerbare la gravità delle patologie metaboliche attraverso la generazione di meccanismi di feedback che conducono ad un aumento della lipolisi (Sordillo and Raphael, 2013). Anche se la potenzialità di insulino-resistenza indotta da obesità non è ancora stata accertata nei bovini, vi è un modello che indica che questo potrebbe essere possibile (Pires et al., 2007).

1.1.2 Mobilizzazione delle riserve corporee

La mobilizzazione delle riserve lipidiche corporee è un meccanismo adattativo fisiologico diretto dal sistema endocrino che i mammiferi utilizzano per sopravvivere in periodi di carenza di nutrienti ed energia. Nel caso delle bovine da latte questo fenomeno biologico avviene per supportare le richieste nutrizionali imposte dalla lattazione e si realizza grazie alla lisi del tessuto adiposo (Angeli et al., 2019b). Durante il periodo di transizione la lipolisi viene favorita da una serie di cambiamenti ormonali, tra cui: ridotti livelli plasmatici di insulina e glucosio; alterata sensibilità all'insulina nel tessuto adiposo e in altri tessuti periferici; disaccoppiamento dell'asse somatotropo; elevate concentrazioni ematiche di catecolamine, ormone della crescita (Growth Hormone, GH) e glucocorticoidi (Herdt, 2000). Attraverso questo processo le lipasi presenti nel tessuto adiposo catabolizzano i trigliceridi in esso contenuti in glicerolo e acidi grassi non esterificati (Non-Esterified Fatty Acids, NEFA), i quali vengono trasportati dallo spazio extra-cellulare al sangue principalmente grazie al legame con l'albumina (Contreras et al., 2010).

L'effetto di un'aumentata lipolisi è quindi il rialzo delle concentrazioni plasmatiche di NEFA, i quali vengono utilizzati come substrato energetico alternativo in vari tessuti (Contreras and Sordillo, 2011). In condizioni fisiologiche, la fonte di energia utilizzata nel fegato per la produzione di glucosio è l'acido propionico, che viene prodotto nel rumine insieme all'acido acetico e butirrico grazie alle fermentazioni dei carboidrati presenti nella razione. Se i livelli di acido propionico ottenuto sono ridotti a causa del calo dell'ingestione, il fegato utilizza i NEFA per la produzione di energia. I NEFA captati dal fegato possono andare incontro a ossidazione completa con formazione di energia, ri-esterificazione in trigliceridi ed esportazione sotto forma di lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), oppure ri-esterificazione in trigliceridi con stoccaggio negli epatociti (White, 2015). L'ossidazione completa dei NEFA genera acetil-coenzima A, un metabolita che può essere utilizzato per la produzione di energia attraverso il ciclo di Krebs. Tuttavia, il ciclo di Krebs subisce un sovraccarico in presenza di elevate quantità di NEFA da ossidare, in quanto il fegato ha una capacità

limitata di metabolizzare l'acetil-coenzima A. Di conseguenza, questo metabolita viene utilizzato per la produzione di corpi chetonici: acido aceto acetico, acetone, β -idrossibutirrato (Aschenbach et al., 2010). Il β -idrossibutirrato (BHB) è la forma predominante dei corpi chetonici presente nel sangue delle bovine da latte e la sua concentrazione è un indicatore dell'ossidazione degli acidi grassi. Al contrario, le concentrazioni di NEFA riflettono l'estensione della mobilizzazione delle riserve lipidiche, volta a compensare lo squilibrio tra i nutrienti che la vacca ottiene dalla dieta attraverso l'ingestione e i nutrienti che vengono persi con il latte (LeBlanc, 2010). L'innalzamento delle concentrazioni ematiche di NEFA e BHB è l'hallmark metabolico del periodo di transizione, soprattutto in bovine altamente produttive (Bell, 1995).

Un innalzamento eccessivo di questi metaboliti, tuttavia, è spesso associato a complicanze del periodo di transizione quali ulteriore riduzione dell'ingestione, immunosoppressione, infertilità, ridotta produzione di latte, e a scarse performances produttive e riproduttive (Wankhade et al., 2017). Elevate concentrazioni di NEFA, infatti, sono anoressizzanti, oltre ad essere associate ad un'incidenza più elevata di patologie metaboliche nel periodo che precede e segue il parto (Bobe et al., 2004). È stato inoltre dimostrato che l'aumento di NEFA in circolo è in grado di alterare la funzionalità delle cellule immunitarie dell'animale, il che potrebbe in parte spiegare la sospetta relazione tra NEB e immunosoppressione (Contreras and Sordillo, 2011; Lacasse et al., 2018). Livelli ematici elevati di BHB nel post-partum, invece, sono associati ad altre condizioni metaboliche, quali chetosi, metrite e mastite (LeBlanc, 2010). Secondo alcuni studi i NEFA sono indicatori più precisi se utilizzati nel periodo preparto, mentre nella prima fase di lattazione i valori di BHB sono più efficienti per la diagnosi di chetosi subclinica in bovine ad alta produzione (González et al., 2011). Un altro studio ha dimostrato, invece, come le concentrazioni di NEFA nel post-partum, da 3 a 14 giorni di lattazione, abbiano una correlazione più significativa con il rischio di sviluppare patologie della transizione rispetto alle concentrazioni di BHB o di NEFA misurate nel preparto (Ospina et al., 2010). Le concentrazioni di BHB sono variabili durante il giorno e sono generalmente più elevate 4 o 5 ore dopo il pasto, mentre le concentrazioni di NEFA sono generalmente più alte prima del pasto (Oetzel, 2004).

È stato dimostrato che bovine alimentate con diete iperenergetiche durante l'asciutta hanno concentrazioni post-partum di NEFA e BHB più elevate rispetto a bovine sottoposte ad una dieta controllata dal punto di vista energetico (Abuelo et al., 2019). Il motivo di questo fenomeno non è ancora del tutto chiaro. Inizialmente si ipotizzava che bovine con elevate concentrazioni di BHB soffrissero di ridotta sensibilità all'insulina specificatamente nel tessuto adiposo (Abuelo et al., 2016), il che condurrebbe ad un maggior grado di mobilizzazione nel post-partum. Secondo alcuni, invece, le differenze nelle concentrazioni sieriche di NEFA e BHB sono probabilmente imputabili a

un NEB più grave nel post-partum delle bovine alimentate con un quantitativo maggiore di energia. Questo si rifletterebbe in concentrazioni ematiche di glucosio e insulina ridotte e nell'aumento della mobilizzazione del tessuto adiposo piuttosto che in cambiamenti nella risposta di questo stesso tessuto all'insulina (Mann et al., 2016).

1.1.3 Regolazione della glicemia

Nonostante il glucosio sia il principale prodotto della digestione dei carboidrati introdotti con la dieta, esso viene rapidamente trasformato nel rumine in acidi grassi volatili (Volatile Fatty Acids, VFA), e deve essere nuovamente sintetizzato nel fegato attraverso la gluconeogenesi (Aschenbach et al., 2010). I requisiti in termini di glucosio impongono uno sforzo importante sulla fisiologia della bovina da latte. Gli acidi grassi volatili disponibili sono in grado di soddisfarne le esigenze per circa l'85% nella prima fase di lattazione, lasciando di conseguenza un deficit di questa molecola (Bell, 1995). Le bovine da latte vanno incontro ad una serie di meccanismi compensativi il cui scopo è elevare le concentrazioni ematiche di glucosio. Il principale è l'alterazione dell'asse somatotropo, ovvero del GH (Wankhade et al., 2017). L'aumento delle concentrazioni di questo ormone durante la prima fase di lattazione ha la funzione di stimolare la gluconeogenesi a livello epatico ed induce contemporaneamente una condizione di insulino-resistenza, prevenendo l'utilizzo del glucosio da parte di fegato, muscolo e tessuto adiposo, e stimolando la lipolisi, con liberazione di acidi grassi prevalentemente non esterificati, che vengono utilizzati come fonte di energia per la bovina durante il periodo post-partum (Ceciliani et al., 2018).

L'insulina è un potente regolatore della lipogenesi ed un potente antagonista dell'azione lipolitica del GH, in quanto stimola l'accumulo di riserve di glucosio negli adipociti, nel muscolo scheletrico e nel fegato. Sia la lipolisi che la lipogenesi sono influenzate dalle concentrazioni di insulina in circolo, oltre che dalla responsività e sensibilità del tessuto adiposo all'insulina stessa (Mann et al., 2016). Lo stato di ipo-insulinemia e di aumentata resistenza all'insulina nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo è un effetto del GH che si manifesta durante la prima fase di lattazione della bovina (Pires et al., 2007; McFadden, 2020). Questo provoca una maggiore mobilizzazione delle riserve corporee, e al contempo una maggiore disponibilità di glucosio per l'uptake insulino-indipendente da parte della ghiandola mammaria per la sintesi di latte (Contreras and Sordillo, 2011). È stato dimostrato che bovine a cui viene somministrata una dieta iperenergetica durante l'asciutta hanno livelli più bassi di insulina nell'immediato post-partum, con un minore effetto anti-lipolitico diretto ed indiretto mediato da questo ormone (Mann et al., 2016). Inoltre, le bovine selezionate per l'elevata produzione di latte mostrano una maggiore insulino-resistenza (Roche et al., 2009).

Il glucosio è richiesto sia nel periodo immediatamente precedente il parto, in quanto necessario per la crescita del feto, sia nel post-partum, dove è fondamentale in quanto principale zucchero utilizzato per la sintesi del latte (Reynolds et al., 2003; Lucy et al., 2014). Esso è in grado di orchestrare il metabolismo dell'animale attraverso la regolazione delle concentrazioni ematiche di insulina e Insuline-like Growth Factor 1 (IGF-1). Esso provoca il rilascio di insulina, che a sua volta dirige i nutrienti verso il tessuto adiposo ed il muscolo scheletrico (effetto anabolico) e stimola il rilascio in circolo di IGF-1 da parte del fegato. Finché le concentrazioni di glucosio sono basse, anche i livelli di insulina e IGF-1 rimangono bassi, mantenendo l'animale in uno stato catabolico durante la lattazione (Fiore et al., 2014). Nonostante l'ipoglicemia sia vantaggiosa da questo punto di vista, una scarsa riserva di glucosio conduce ad una incompleta o solo parziale ossidazione dei NEFA, con un conseguente aumento delle concentrazioni di corpi chetonici nel primo periodo post-partum (White, 2015).

La carenza di glucosio viene corretta solamente dopo il picco di lattazione, quando la produzione di latte decresce. Contemporaneamente le concentrazioni di insulina e IGF-1 si rialzano, e la bovina dirige il glucosio nuovamente verso il tessuto adiposo ed il muscolo scheletrico (Fiore et al., 2014). Il cambiamento dallo stato catabolico allo stato anabolico sembra essere inoltre la chiave per la ripresa della funzionalità riproduttiva dell'animale (Lucy et al., 2014; D'Occhio et al., 2019).

1.1.4 Funzionalità epatica

Il fegato svolge un ruolo centrale per il metabolismo e le bovine sono particolarmente predisposte a patologie epatiche di natura metabolica (Kalaitzakis et al., 2007). Nel corso del periodo di transizione, il fegato è l'organo chiave che coordina i cambiamenti morfologici e biochimici che la bovina deve compiere per adattarsi e superare uno stato di NEB (Wathes et al., 2007; Angeli et al., 2019a). Il suo funzionamento in risposta alle richieste dell'organismo è un prerequisito essenziale perché la bovina non manifesti disordini metabolici (Reynolds et al., 2003; Graber et al., 2010). La funzionalità epatica è strettamente connessa ai cambiamenti osservabili a livello plasmatico, e può essere valutata attraverso l'attività di alcuni enzimi, quali l'aspartato aminotransferasi (AST), l'alanina aminotransferasi (ALT), la γ -glutamyl-transferasi (GGT), oltre che attraverso la concentrazione ematica di bilirubina (van Dorland and Bruckmaier, 2013; Puppel and Kuczyńska, 2016).

L'ALT e l'AST sono due enzimi che possono evidenziare dei danneggiamenti tissutali, in particolare del parenchima epatico e del tessuto muscolare, e si trovano rispettivamente a livello citoplasmatico e mitocondriale (Stojević et al., 2005). Tuttavia, la correlazione tra l'aumento sierico dell'ALT e le

patologie di natura epatica è pressoché insignificante nei ruminanti. Al contrario, le aumentate concentrazioni sieriche di AST sono maggiormente indicative di un danno più grave, anche di natura subclinica (Sakowski et al., 2012). Tra i tre enzimi citati in precedenza, questo sembra essere l'indicatore più sensibile di lesioni epatiche (González et al., 2011). La GGT è, invece, un enzima di membrana le cui concentrazioni plasmatiche aumentano in corso di patologie epatobiliari e colestasi (Stefani et al., 2011). Nelle bovine da latte, la determinazione dell'attività di AST e GGT è associata a fenomeni di lipidosi epatica, anoressia e chetosi nella prima parte della lattazione (Sejersen et al., 2012). In condizioni fisiologiche le attività di AST e GGT mostrano cambiamenti irregolari durante la gestazione e la prima parte della lattazione; in corso di patologie epatiche, invece, tutti questi indicatori mostrano generalmente un aumento delle loro concentrazioni sieriche (Imhasly et al., 2014; Du et al., 2017). Essi possono subire, in ogni caso, delle variazioni sulla base del momento della giornata, dell'età della bovina e del suo status energetico (Stojević et al., 2005).

La bilirubina è invece un prodotto del catabolismo dell'emoglobina che raggiunge il fegato attraverso il circolo sanguigno, nel quale viaggia legata all'albumina (bilirubina non coniugata, indiretta). Una volta arrivata al fegato, viene coniugata con acido glucuronico ed escreta attraverso la bile (bilirubina coniugata, diretta) in condizioni fisiologiche. La sua rimozione dal parenchima epatico è sotto il controllo di attività enzimatiche. La concentrazione di bilirubina totale misurabile nel sangue è data dalla somma della bilirubina indiretta e diretta (Stefani et al., 2011). I livelli di bilirubina durante il periodo di transizione possono essere modificati indirettamente dall'azione di citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-1 e IL-6) rilasciate dalle cellule immunitarie (Bionaz et al., 2007). L'effetto principale delle citochine a livello del fegato è la stimolazione di una risposta di fase acuta, caratterizzata dall'aumentata sintesi di proteine di fase acuta positive, come aptoglobina e ceruplasmina, ed una diminuzione nella sintesi di proteine di fase acuta negative, quali albumina e paraoxonasi (Bertoni et al., 2008; Bossaert et al., 2012). Nell'ambito di una risposta di fase acuta negativa, quindi, una diminuzione nella sintesi degli enzimi responsabili della clearance di bilirubina può portare al suo accumulo nel parenchima epatico, con conseguente danno, ed all'aumento delle sue concentrazioni ematiche (Bionaz et al., 2007; Bertoni and Trevisi, 2013). Le concentrazioni di bilirubina mostrano generalmente una leggera crescita immediatamente prima del parto, ed un aumento deciso nei successivi sette giorni, tornando a valori simili a quelli riscontrati nel periodo dell'asciutta dopo quattro o cinque settimane di lattazione (Bertoni et al., 2008).

1.1.5 Stress metabolico, stress ossidativo e immunosoppressione

È ormai noto come la maggior parte delle patologie che colpiscono le bovine da latte si concentri in due momenti specifici della loro vita: il periodo di transizione, per le patologie metaboliche ed infettive, e il periodo neonatale, ovvero le prime settimane di vita dell'animale, per le patologie gastroenteriche e respiratorie. Il fatto che l'animale sia più suscettibile a diverse patologie in questi due momenti specifici sembra dipendere da una risposta immunitaria scorretta (Castillo et al., 2005; Contreras and Sordillo, 2011).

Lo stress metabolico riflette la distruzione dell'omeostasi fisiologica ed è caratterizzato da eccessiva lipomobilizzazione, stress ossidativo, e disfunzione infiammatoria o immunitaria. Questi tre processi sono tra loro collegati e risultano in disordini immunitari e metabolici associati ad un aumento del rischio di patologie durante il periodo di transizione (Abuelo et al., 2019). L'aumentata mobilizzazione lipidica conseguente al NEB, che è stata precedentemente spiegata, può comportare una maggiore produzione di specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS) e dell'azoto (Reactive Nitrogen Species, RNS) associabili allo stress ossidativo (Sordillo and Raphael, 2013).

Nell'ultimo decennio, alcuni studi hanno dimostrato che le bovine adulte nel periodo che circonda il parto vanno incontro a stress ossidativo, che influisce negativamente sulla risposta immunitaria (Castillo et al., 2005, Abuelo et al., 2019). Lo stress ossidativo è conseguenza di un'alterazione dell'equilibrio tra sostanze pro-ossidanti e antiossidanti (redox imbalance), ed è associato ad un aumentato rischio di patologie in quanto esso diminuisce le capacità funzionali delle cellule immunitarie, con conseguente danno e/o disfunzione cellulare. Le cellule immunitarie sono particolarmente sensibili allo stress ossidativo in quanto le loro membrane contengono acidi grassi poli-insaturi in alte concentrazioni, i quali vanno incontro a perossidazione lipidica rilasciando alte quantità di ROS (Contreras et al., 2010; Abuelo et al., 2019). Fisiologicamente, la bovina dovrebbe possedere una quantità sufficiente di sostanze antiossidanti atte a contrastare la continua produzione di ROS e RNS da parte del metabolismo. Se la bovina, tuttavia, manifesta un minore DMI, assume una minore quantità di sostanze antiossidanti con la dieta, e ciò può contribuire a spostare l'equilibrio redox verso la condizione ossidativa. Quando la generazione di ROS supera la capacità dell'organismo di contrastarle si genera una condizione di stress ossidativo, con conseguente danno cellulare o tissutale (Castillo et al., 2005).

È stato dimostrato che le bovine in transizione hanno un'importante reazione infiammatoria legata alla gravidanza e al parto (Sordillo et al., 2009) che si manifesta anche in assenza di segni di infezione

microbica e/o di altre patologie (Bionaz et al., 2007; Bertoni et al., 2008). Questo è comprovato ulteriormente dalle concentrazioni elevate di proteine di fase acuta qualche ora dopo il parto, riscontrabile in quasi tutte le bovine indipendentemente dalla presenza di un'infezione uterina vera e propria (Trevisi and Minuti, 2018). Sulla base degli studi citati sembra sussistere effettivamente una correlazione tra immunosoppressione, incidenza delle patologie metaboliche, infiammazione e stress ossidativo (Trevisi et al., 2012). L'immunosoppressione a cui vanno incontro le bovine durante il periodo di transizione dipende sia da fattori endocrini che metabolici, ma soprattutto dall'inizio della lattazione. Alcuni importanti elementi che contribuiscono all'insorgenza di un'alterata funzionalità immunitaria sono le elevate concentrazioni di NEFA e BHB, e l'ipoglicemia (Abuelo et al., 2019). Da un lato, infatti, il glucosio è vitale per un adeguato funzionamento metabolico e immunitario in quanto è il principale carburante utilizzato da molte cellule immunitarie (LeBlanc, 2010). D'altro canto, si sospetta che l'eccessiva mobilitazione delle riserve lipidiche e lo stress ossidativo contribuiscano ad una risposta flogistica eccessiva e sregolata durante il periodo di transizione. I NEFA e il BHB potrebbero essere quindi responsabili della soppressione della risposta immunitaria, e contribuire in tal modo allo sviluppo di patologie metaboliche o infettive (Bionaz et al., 2007; Sordillo et al., 2009).

Al tempo stesso, però, non bisogna considerare per forza negativamente la condizione pro-infiammatoria che si verifica durante il periodo di transizione (Bertoni et al., 2008): la flogosi, infatti, contribuisce al meccanismo del parto e sembra avere inoltre un ruolo nell'adattamento omeostatico dell'organismo alla produzione di latte (Farney et al., 2013). Il problema sembra risiedere nel livello di infiammazione che si scatena durante questo periodo, in quanto reazioni infiammatorie non regolate ed eccessive sono importanti per la patogenesi di vari disordini. Il grado di infiammazione e di stress ossidativo osservabile durante la transizione dipende anche da fattori ambientali stressanti, come lo stress da caldo, patologie concomitanti e obesità (Sordillo and Raphael, 2013). In ogni caso l'influenza dello stress ossidativo sulla salute dei ruminanti è un ambito di ricerca ancora relativamente recente (Abuelo et al., 2019).

1.2 Patologie epatiche del periodo di transizione

Approssimativamente, il 75% delle patologie che colpiscono la bovina adulta si verifica nel primo mese post-partum (LeBlanc et al., 2006). Le patologie della transizione rappresentano una manifestazione dell'incapacità della bovina di fare fronte alle elevate esigenze energetiche necessarie per la produzione di latte, e continuano ad essere fonte di importanti perdite economiche

per questa tipologia di allevamento, oltre ad essere motivo di preoccupazione dal punto di vista del benessere animale (Mulligan and Doherty, 2008). Chetosi e lipidosi in primis rappresentano il fallimento dei meccanismi adattivi al NEB. Le loro conseguenze in termini di salute e produttività possono protrarsi anche a lungo nella lattazione successiva (Herdt, 2000).

Considerare singolarmente le patologie della transizione è un errore, in quanto molte di queste, come chetosi, lipidosi, ipocalcemia, ritenzione di placenta, metrite e dislocazione dell'abomaso, sono collegate dal punto di vista eziologico (Ingvarsen et al., 2003). Si parla generalmente di "production diseases" per includere non solo condizioni di origine metabolica vera e propria, quali chetosi, ipocalcemia e ipomagnesemia, ma anche patologie di altra natura: ritenzione di placenta, laminite, dislocazione abomasale. Nell'insorgenza di tali patologie sono implicati fattori sia produttivi che ambientali, in particolare del periodo precedente il parto (Abuelo et al., 2019). La loro patogenesi non sembra essere legata direttamente alla produzione di latte, quanto più ad errori nel management alimentare ed al ridotto DMI della bovina in questa fase (Ingvarsen et al., 2003). Il verificarsi di una di queste patologie esita spesso in un effetto a cascata, con un'aumentata incidenza di altre condizioni patologiche e zoppia, riduzione della fertilità e della produzione di latte. L'implicazione di fattori nutrizionali, ambientali e sociali, oltre alla complessa interazione tra le diverse patologie, ne rende difficile la prevenzione ed il controllo (Mulligan and Doherty, 2008).

1.2.1 Chetosi

Per chetosi, o acetonemia, si intende una condizione metabolica in cui vi è una concentrazione elevata di corpi chetonici (Peek and Divers, 2018). L'incidenza di questo disordine metabolico è massima nella prima settimana post-partum ed in diminuzione dopo il primo mese di lattazione (Tatone et al., 2017).

La chetosi può essere suddivisa in tre tipologie. La chetosi di tipo I, o primaria, si verifica quando le richieste di glucosio superano la capacità gluconeogenica del fegato. In questo caso il meccanismo eziopatogenetico sottostante è un'insufficiente quantità di precursori del glucosio (Herdt, 2000). La chetosi di tipo II, o secondaria, è caratterizzata invece da iper-insulinemia e si verifica quando elevate quantità di NEFA originate dalla lipolisi vengono trasportate al fegato ma la gluconeogenesi e la chetogenesi non sono completamente attive (Oetzel, 2004). Di conseguenza, i NEFA che non vengono utilizzati per la sintesi di corpi chetonici all'interno dei mitocondri vengono esterificati nel citosol, andando a costituire i trigliceridi. Poiché la capacità dei ruminanti di sintetizzare VLDL per il trasporto dei trigliceridi al di fuori del fegato è limitata, in particolar modo durante la prima fase di lattazione, questi lipidi tendono ad accumularsi nel parenchima epatico quando le concentrazioni

di NEFA sono elevate (Ospina et al., 2010; Giannuzzi et al., 2021). Così ha origine la lipidosi epatica, che è spesso associata a questa tipologia di chetosi. La conseguente alterazione della funzionalità degli epatociti può comportare immunosoppressione e ridotta risposta alla terapia (Oetzel, 2004). La chetosi di tipo II si riscontra solitamente dopo il parto, ben prima del picco di lattazione, ed è caratterizzata da concentrazioni di corpi chetonici inferiori rispetto alla chetosi di tipo I (Herdt, 2000). La chetosi di tipo III, o chetosi alimentare, si verifica invece quando la razione somministrata alle bovine è eccessivamente energetica ed esita in un'augmentata produzione ruminale di butirrato, fonte di corpi chetonici (Constable et al., 2017).

Un'ulteriore classificazione si basa invece sul criterio clinico (Puppel and Kuczyńska, 2016). Si parla di chetosi subclinica o iperchetonemia nel caso in cui bovine clinicamente sane presentino valori ematici elevati di corpi chetonici (Loiklung et al., 2022). Come corpi chetonici si fa comunemente riferimento al BHB in quanto composto più stabile rispetto ad acetone ed acetoacetato. Negli anni sono state proposte diverse soglie per poter definire una condizione di iperchetonemia nella bovina da latte, ed i tre principali cutoff utilizzati per la concentrazione plasmatica di BHB sono 1.0 mmol/L; 1.2 mmol/L; 1.4 mmol/L (Constable et al., 2017). Si ritiene che almeno il 50% delle bovine vada incontro ad una condizione temporanea di chetosi subclinica nel primo mese di lattazione (Wathes et al., 2007).

Per chetosi clinica si intende invece l'aumento dei livelli ematici, lattei e urinari di corpi chetonici accompagnato da segni clinici tra cui inappetenza, stipsi e feci secche, rapida perdita di peso, calo della produzione latte, performances riproduttive inadeguate ed occasionalmente forme nervose (Gordon et al., 2013). Bovine con chetosi clinica mostrano una riduzione del DMI e tendono a selezionare i foraggi rispetto ai concentrati. Generalmente i parametri vitali (temperatura, frequenza cardiaca e frequenza respiratoria) non deviano dai range fisiologici, a meno che non coesistano altre condizioni patologiche. In alcune bovine si realizza anche acidosi metabolica (Peek and Divers, 2018). Molte bovine con questa condizione mostrano una concentrazione ematica di BHB superiore a 2.5 mmol/L (Oetzel, 2004). L'incidenza della chetosi clinica è estremamente variabile negli allevamenti e si attesta generalmente tra 0.2 e 10% (Constable et al., 2017).

La chetosi, sia essa clinica o subclinica, rappresenta un grave problema per lo stato di salute della bovina (Tatone et al., 2017). Generalmente, solamente i casi gravi di chetosi vengono diagnosticati in allevamento quando un programma accurato di monitoraggio non viene adeguatamente applicato. Tali mancate diagnosi hanno conseguenze negative per l'azienda in quanto bovine con chetosi subclinica sono comunque predisposte ad altre patologie (Cainzos et al., 2022). Sono rari i casi dove questa patologia è irreversibile e porta a morte l'animale; le principali perdite economiche derivano dal calo della produzione e qualità del latte, dalle scarse performances riproduttive e dall'aumento

dell'incidenza di patologie peripartali ed ovariche, metriti, mastiti (LeBlanc, 2010; Constable et al., 2017).

Per molte delle patologie della transizione, la diagnosi ed il monitoraggio si basano sull'utilizzo di indicatori ematici, il cui innalzamento o abbassamento rispetto ai valori soglia sono indicativi di un fallimento nei meccanismi omeostatici dell'animale (Ingvarlsen et al., 2003). La capacità di predire, di fronte al singolo capo, quali animali siano più predisposti a sviluppare patologia sulla base delle concentrazioni di NEFA e BHB può essere un aiuto concreto per gli allevatori nella prevenzione attiva delle patologie, attraverso un focus sul management e sulle strategie nutrizionali che si possono introdurre per evitare patologie cliniche e subcliniche (Ospina et al., 2010).

La diagnosi di chetosi si basa sulla misurazione delle concentrazioni di corpi chetonici grazie a test di laboratorio o test rapidi da eseguire in campo. I corpi chetonici possono essere rilevati nel respiro (odore di acetone), nell'urina, nel latte o nel sangue. Il campione individuale di urina è un test che prevede l'utilizzo di strip da inserire nel campione biologico; rappresenta un test non invasivo, facilmente accessibile e moderatamente sensibile (96%) per il rilevamento di acido aceto-acetico, ma è caratterizzato tuttavia da bassa specificità (49-59%) per la rilevazione di chetosi subclinica (Constable et al., 2017). Il campione individuale di latte è invece un test facile da eseguire, non invasivo, più costoso rispetto al test precedente, scarsamente sensibile ma altamente specifico; per l'analisi si utilizza la spettrometria a infrarossi. Questo rappresenta un buon metodo di diagnosi precoce (Cascone et al., 2022). Se si utilizza un valore soglia nel latte di 100 $\mu\text{mol/L}$, che corrispondono ad un range sierico di 1.0-1.4 mmol/L , la sensibilità del test si aggira intorno all'83% e la specificità all'82% (Oetzel, 2004); la specificità diminuisce, tuttavia, per il rilevamento di chetosi subclinica (Loiklung et al., 2022). La metodica più attendibile in campo per la diagnosi di chetosi è rappresentata, tuttavia, dal campione di sangue per la valutazione del BHB (Loiklung et al., 2022). Questo è un test di campo che prevede l'utilizzo di apposite macchinette con strip per la misurazione immediata su una singola goccia di sangue, ed è dotato di elevata sensibilità e specificità, oltre ad essere molto pratico. Le concentrazioni ematiche post-partum di BHB, infatti, sono i biomarkers più efficaci per individuare chetosi subclinica in bovine nella prima parte della lattazione (Seifi et al, 2011). Il monitoraggio della chetosi nella mandria attraverso l'analisi dei dati e l'utilizzo di test di campo per la valutazione del BHB ematico a settimane alterne nel periodo da 3 a 14 giorni di lattazione (Days in Milk, DIM) permette di valutare la prevalenza di tale patologia all'interno della mandria, e di intervenire eventualmente con la terapia sulle bovine che presentano un valore di BHB maggiore di 1.2 mmol/L , per evitare un'ulteriore progressione della chetosi (McArt et al., 2012; Tatone et al., 2017). Nel periodo più recente, inoltre, l'applicazione della

metabolomica sembra avere un discreto successo come strumento diagnostico e preventivo, attraverso l'identificazione dei soggetti maggiormente suscettibili a questa patologia (Kenéz et al., 2016; Cecilianì et al., 2018).

Quando si considera il trattamento terapeutico da attuare in corso di chetosi, bisogna sempre tenere a mente il meccanismo fisiopatologico che la bovina da latte attraversa durante il periodo di transizione. I punti chiave per una terapia razionale sono garantire glucosio alla bovina, stimolare la gluconeogenesi a livello epatico e diminuire la lipolisi del tessuto adiposo (Gordon et al., 2013). Alcuni trattamenti prevedono l'utilizzo di precursori del glucosio, spesso associati ad altre terapie. Il destrosio, ad esempio, ha rappresentato per un lungo periodo l'approccio terapeutico prevalente nei confronti della chetosi, ma alcuni studi hanno dimostrato una sua efficacia solo temporanea sulla riduzione delle concentrazioni di BHB, con durata inferiore alle 12 ore (Wagner and Schimek, 2010). Il glicerolo è il principale componente dei trigliceridi, oltre ad essere un precursore del glucosio e costituire quindi una fonte energetica per i ruminanti; il suo assorbimento dal rumine ne garantisce l'utilizzo nel processo di gluconeogenesi a livello del fegato, oltre alla riduzione delle concentrazioni di NEFA (Kupczyński et al., 2020). Il glicole propilenico è, invece, un precursore del glucosio che dal rumine viene assorbito direttamente oppure convertito in propionato, e contribuisce all'innalzamento delle concentrazioni ematiche di insulina ed alla produzione di energia attraverso la gluconeogenesi (McArt et al., 2011). La sua somministrazione in bovine con chetosi subclinica porta ad un aumento della produzione di latte ed un miglioramento dell'aspetto riproduttivo ed immunitario (Cascone et al., 2022).

Vi sono inoltre dei trattamenti che prevedono l'utilizzo di sostanze ormonali, come i glucocorticoidi e l'insulina (Constable et al., 2017). I glucocorticoidi sono in grado di aumentare la biodisponibilità dei precursori endogeni del glucosio, inducendo quindi iperglicemia, ma non contribuiscono a diminuire le concentrazioni di NEFA o BHB (Jorritsma et al., 2004). L'utilizzo dell'insulina è stato proposto per la terapia della chetosi considerando lo stato di insulino-resistenza manifestato dalla maggior parte delle bovine da latte durante il periodo di transizione (Gordon et al., 2013).

Altri trattamenti aggiuntivi sono costituiti da supplementi di cobalamina, la cui produzione ed assorbimento risultano essere ridotte in corso di chetosi (Peek and Divers, 2018); di carnitina, che svolge un ruolo importante nella β -ossidazione degli acidi grassi a lunga catena e influenza quindi l'accumulo di lipidi nel fegato (Carlson et al., 2007); e di metionina, che promuove la sintesi di VLDL e limita quindi l'accumulo di lipidi nel fegato nel periodo post-partum (Sun et al., 2016).

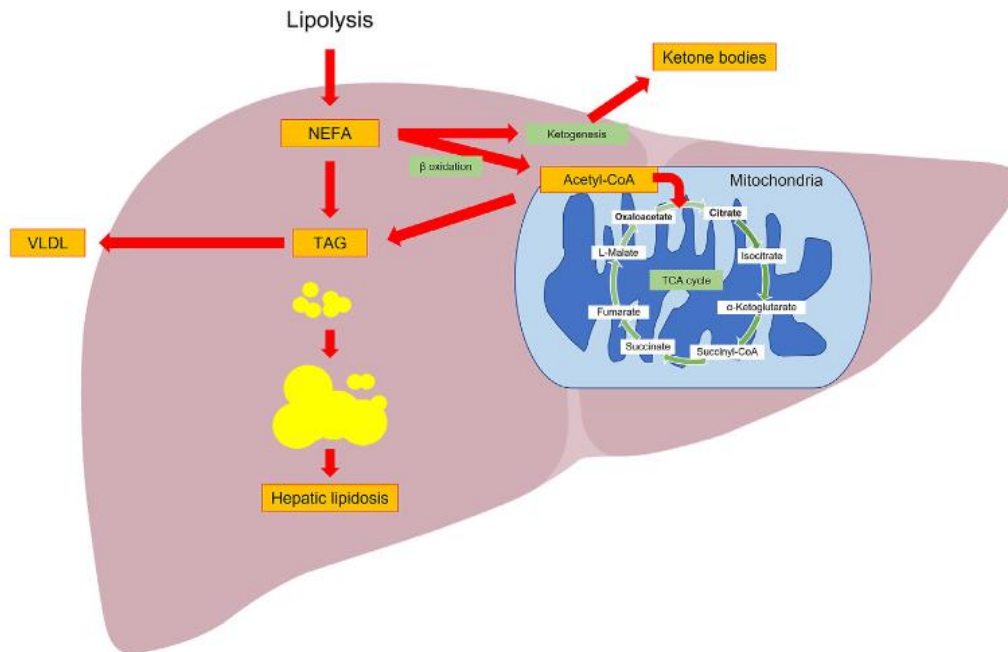
Negli anni sono state sviluppate diverse alternative per la prevenzione ed il controllo della chetosi. L'utilizzo di strategie nutrizionali con lo scopo di ridurre al minimo i deficit energetici e la mobilizzazione lipidica nella prima parte della lattazione è sicuramente efficace (Caixeta and Omontese, 2021), oltre ad un corretto management dei gruppi di bovine sulla base di differenti regimi alimentari. Un grande contributo alla salute generale dell'animale è dato anche dal libero accesso alla mangiatoia e all'area di riposo, oltre ad una corretta temperatura e velocità dell'aria nell'ambiente di stabulazione (Cascone et al., 2022). Il controllo del BCS preparto rappresenta un altro punto fondamentale della prevenzione di patologie metaboliche (Tatone et al., 2017): bovine con BCS superiore a 3.5 su 5, infatti, sono maggiormente predisposte a sviluppare chetosi e lipidosi, con possibile immunosoppressione come conseguenza diretta o indiretta di un eccessivo NEB (Ingvarlsen et al., 2003). Anche l'utilizzo di sostanze da somministrare alle bovine nel periodo che precede il parto rappresenta un efficace strumento preventivo. Tra queste si riconoscono principalmente antimicrobici ionofori, corticosteroidi, propionato e la cianocobalamina (Drong et al., 2016; Constable et al., 2017; Mammi et al., 2021). Infine, vi sono diversi studi che riportano come l'accorciamento della durata del periodo di asciutta o la sua eliminazione in toto siano in grado di migliorare il bilancio energetico post-partum della bovina, diminuendo contestualmente il rischio di chetosi nella prima fase della lattazione (Mayasari et al., 2017).

1.2.2 Lipidosi

Oltre a gradi diversi di iperchetonemia, molte bovine vanno incontro ad un fenomeno più o meno marcato di lipidosi epatica durante il periodo di transizione. La lipidosi epatica (fatty liver syndrome) si verifica quando la captazione di acidi grassi da parte del fegato eccede la capacità dell'organo stesso di ossidarli ed eliminarli sotto forma di VLDL. È una condizione che ha luogo solitamente entro le prime quattro settimane di lattazione e risulta nell'accumulo di lipidi nel parenchima epatico (Kessler et al., 2014). È la patologia epatica più comune nelle bovine ad alta produzione latte, ed è strettamente associata alla chetosi (Giannuzzi et al., 2021).

Nei ruminanti i lipidi che si accumulano nel parenchima sono prevalentemente trigliceridi (TAG) (Drackley, 1999), ed il loro contenuto nel fegato non è correlato tanto alla loro sintesi, quanto piuttosto è modulato dalla capacità di quest'organo di eliminare le VLDL (Kessler et al., 2014). L'accumulo di materiale lipidico va progressivamente ad ostacolare la normale struttura e funzionalità delle cellule, con possibile rilascio conseguente di enzimi dagli epatociti (Kalaitzakis et al., 2007).

Figura 1.1 Metabolismo degli acidi grassi mobilizzati nel ciclo di Krebs e sviluppo di lipidosi epatica (Gross, 2023).



La lipidosi epatica che si riscontra nelle bovine da latte presenta molte similitudini con la lipidosi non legata al consumo di alcol che si riscontra in medicina umana (Ceciliani et al., 2018). Nell'uomo è stato dimostrato come i NEFA inducano apoptosi degli adipociti in corso di lipidosi epatica (Malhi and Gores, 2008). Gli effetti di questa patologia sull'adattamento dell'animale al NEB, tuttavia, sono tutt'ora poco chiari, così come il meccanismo eziopatogenetico preciso che conduce a tale condizione (Bobe et al., 2004). Sembra che la lipidosi sia in grado di interferire con il processo di gluconeogenesi epatica, complicando ulteriormente l'adattamento della bovina al periodo di transizione (Cadorniga-Valino et al., 1997). L'infiltrazione lipidica è particolarmente significativa nelle bovine da latte in quanto circa l'85% del glucosio necessario per il metabolismo deriva dal fegato, che a sua volta gioca un ruolo centrale nella regolazione dell'ingestione, della fertilità e dell'immunità (Mulligan and Doherty, 2008). La rilevanza clinica di tale condizione deriva principalmente dalla riduzione della produzione di latte, dall'aumentata incidenza di patologie metaboliche e ridotta fertilità, dalla diminuzione dello stato di benessere dell'animale e infine dai costi necessari per il trattamento veterinario (Starke et al., 2010; Gross, 2023).

La lipidosi epatica può assumere almeno tre forme diverse: essere clinicamente silente in bovine con chetosi subclinica; essere l'esito di una mobilizzazione cronica delle riserve adipose dopo una chetosi clinica precoce; o rappresentare un abbondante accumulo lipidico nel fegato associato a chetosi clinica nei primi giorni di lattazione in "overconditioned cows" (Peek and Divers, 2018).

Il contenuto epatico di TAG è stato usato in passato per categorizzare le bovine in sane (meno dell'1% di TAG rispetto al peso del fegato) o presentanti lipidosi epatica di grado lieve (1-5% del peso del fegato), moderato (5-10% del peso del fegato) o grave (oltre il 10% del peso del fegato). Fino al 65% delle bovine da latte sono colpite da un grado moderato (TAG = 50-100 mg/g di fegato pesato fresco) o grave (TAG \geq 100 mg/g di fegato pesato fresco) di lipidosi nella prima parte della lattazione. La forma grave di lipidosi si distingue in una forma non-encefalopatica ed una encefalopatica; per quest'ultima si parla anche di encefalopatia epatica. Nella prima i segni clinici riscontrati sono elevata chetonuria e scarso DMI, nella seconda oltre a questi si riscontra depressione del sensorio, atassia, sonnolenza, coma e morte nei casi più gravi. Questa seconda forma, infatti, a differenza della prima, tende ad essere fatale nonostante intensi trattamenti terapeutici (Bobe et al., 2004).

La maggior parte dei casi di lipidosi compare entro i primi 21 giorni di lattazione, mentre la maggior parte dei casi moderato-gravi o gravi compare nei primi 7 giorni post-partum (Kalaitzakis et al., 2007).

Tabella 1.1 Categorizzazione della lipidosi epatica nelle bovine da latte (Bobe et al., 2004).

Liver category	Liver TAG ¹ (% wet weight)	Urinary ketones	Feed intake, milk production	Health status, reproductive performance	Liver
Normal	<1%	0 ²	0	0	Normal
Mild fatty liver	1–5%	+	0	–	Centrilobular TAG infiltration
Moderate fatty liver	5–10%	++	0	--	TAG infiltration throughout liver
Severe fatty liver	>10%	+++	---	---	Enlarged, necrotic

¹TAG = triacylglycerol.

²The symbols + and – mean positive and negative association, respectively, and the number of symbols represents slight, moderate, or strong association; 0 means no association.

La diagnosi ed il riscontro precoce di questo disordine metabolico sono cruciali per il miglioramento della produzione latte e del profitto di mandria (Giannuzzi et al., 2021). Questa patologia è associata a cambiamenti metabolici ed istologici nel lungo periodo (Fiore et al., 2015). Vi sono diversi strumenti clinici e diagnostici riportati in letteratura per la caratterizzazione di lipidosi epatica lieve, moderata e grave (Kalaitzakis et al., 2007; González et al., 2011). In corso di lipidosi le concentrazioni sieriche degli enzimi epatici AST e GGT sono spesso elevate, il colesterolo è spesso basso e tendenzialmente si riscontra iperbilirubinemia (Sejersen et al., 2012). Altri indicatori metabolici di lipidosi epatica sono le elevate concentrazioni di NEFA, i bassi livelli di glicemia e urea nel siero ematico nella prima fase di lattazione e l'aumento delle concentrazioni di BHB, che risulta essere più elevato rispetto a bovine sane anche in corso di lipidosi epatica lieve (Du et al., 2018). L'utilizzo di panel biochimici che comprendono biomarkers di lipomobilizzazione, funzionalità epatica, stress ossidativo e infiammazione può essere di aiuto nel monitoraggio e

prevenzione di chetosi subclinica e di uno stato precoce di lipidosi (Giannuzzi et al., 2021). La tecnica gold standard per la diagnosi di lipidosi rimane tuttavia la biopsia, in quanto permette di determinare tramite istologia il contenuto epatico di TAG. Dal punto di vista citopatologico, la lipidosi origina inizialmente nella zona centro-lobulare con la formazione di microvacuoli che crescono progressivamente fino a costituire macrovacuoli che coinvolgono la regione intermedia e infine gli epatociti peri-portali. In altri casi, invece, si evidenzia la presenza di microvacuoli disseminati in tutte le regioni del parenchima in assenza di macrovacuoli, così come altri casi dove i microvacuoli si formano inizialmente nella regione peri-portale e poi si estendono verso la vena centro-lobulare (Cebra et al., 1997). Nonostante la biopsia sia il metodo diagnostico più accurato, essa presenta non pochi limiti dal punto di vista dell'applicabilità in campo, in quanto richiede tempo per l'acquisizione del campione e per l'analisi successiva, vi è sempre il rischio di provocare infezioni o emorragie e sembra essere una procedura dolorosa per l'animale (Starke et al., 2010). L'ecografia transcutanea del fegato rappresenta invece una tecnica diagnostica rapida e non invasiva (Giannuzzi et al., 2021).

Il trattamento e la prevenzione della lipidosi epatica si basano sostanzialmente sugli stessi accorgimenti attuati per la prevenzione della chetosi, ovvero la riduzione del grado di lipolisi e conseguentemente delle concentrazioni ematiche di NEFA, il miglioramento dell'ossidazione dei NEFA da parte del fegato e l'aumento della clearance epatica di trigliceridi (Grummer, 2008). Vi sono sempre più evidenze che dimostrano come queste problematiche metaboliche trovino le loro radici nella funzionalità immunitaria e nel DMI della bovina durante le due o tre settimane prima del parto, il che dimostra quanta importanza abbia il management nutrizionale della bovina da latte durante il periodo di transizione (LeBlanc et al., 2006). Per questo è appropriato utilizzare razioni bilanciate sulla base dei requisiti nutrizionali stimati per le bovine in transizione, controllando così il BCS ed eventuali altre patologie che potrebbero aggravare lo stato di salute generale dell'animale (Bobe et al., 2004). Attualmente, selezionare scelte manageriali corrette per la mandria sembra essere l'unica opzione veramente efficace per ridurre l'incidenza di lipidosi epatica negli allevamenti (Grummer, 2008).

1.3 Ecografia epatica durante il periodo di transizione

1.3.1 Funzionamento dell'ecografia

L'ecografia è una tecnica di diagnostica per immagini largamente diffusa in medicina veterinaria, il cui utilizzo in buiatria fino a trent'anni fa rimaneva ristretto principalmente all'apparato riproduttivo delle bovine da latte. Nell'ultimo ventennio, tuttavia, questa tecnica diagnostica ha assunto sempre più importanza sia nel vitello che nel bovino adulto, da latte e da carne, per indagare molti altri distretti corporei (Streeter and Step, 2007). Il vantaggio dell'ecografia rispetto alla radiologia è la maggiore risoluzione del contrasto e la capacità di acquisire immagini di sezioni di organi su piani diversi in tempo reale, attraverso dispositivi portatili e non invasivi (Blond and Buczinski, 2009).

Le immagini ecografiche vengono create grazie alla propagazione degli ultrasuoni all'interno dei tessuti. Gli ultrasuoni sono onde sonore a frequenza talmente elevata, tra i 2 e i 10 MHz, da non poter essere percepite dall'orecchio umano (Spattini, 2008). La loro frequenza è definita come il numero di ripetizioni di una singola onda (ciclo) per secondo, dove un ciclo per secondo corrisponde a 1 MHz. La lunghezza d'onda rappresenta invece la distanza coperta da una singola onda sonora durante un ciclo e determina il potere di penetrazione di tale onda sonora nei tessuti. La velocità del suono in un determinato tessuto è costante e condiziona la frequenza e l'ampiezza degli ultrasuoni che devono essere utilizzati per esaminare un determinato distretto (Blond and Buczinski, 2009).

Nell'attraversare il paziente, il fascio di ultrasuoni viene attenuato a causa delle sue interazioni con i tessuti: riflessione, rifrazione, dispersione (scattering) e assorbimento. La riflessione è un fenomeno che caratterizza un'onda sonora che incontra con angolo perpendicolare una superficie riflettente e ritorna alla sonda. Questa componente del fascio ultrasonografico costituisce la base delle immagini ecografiche (Blond and Buczinski, 2009). La porzione di onde sonore riflesse dai tessuti è direttamente proporzionale alle impedenze acustiche di questi stessi. L'impedenza acustica è il prodotto tra la densità del mezzo attraversato e la velocità di propagazione delle onde sonore all'interno del mezzo stesso (Meola, 2008); maggiore è l'impedenza acustica, maggiore è la capacità di propagazione degli ultrasuoni in quel determinato tessuto (Spattini, 2008). L'ampiezza degli echi riflessi che ritornano alla sonda, e che permettono la formazione dell'immagine ecografica, è proporzionale alla differenza di impedenza acustica tra due tessuti adiacenti attraversati dal fascio di ultrasuoni. Al crescere della differenza, come avviene ad esempio all'interfaccia tessuto molle-gas, aumenta la riflessione dell'onda sonora (Meola, 2008). Nell'addome c'è generalmente una minima

differenza di impedenza acustica tra i diversi tessuti molli, e ciò è ideale in quanto permette la riflessione di una piccola parte delle onde sonore mentre la maggior parte di esse viene trasmessa e permette quindi l'acquisizione di immagini ecografiche delle strutture più profonde. La riflessione delle onde sonore aiuta inoltre a delineare i confini tra i diversi organi. Se un determinato tessuto molle presenta una variazione focale di densità, infatti, la differenza di impedenza acustica con il parenchima circostante ne permette la visualizzazione (Blond and Buczinski, 2009).

La rifrazione è un fenomeno che ha luogo, invece, quando l'onda sonora passa, con un angolo di incidenza obliquo, da un tessuto ad un altro nel quale presenta una diversa velocità di propagazione. Questo risulta in un cambio di direzione dell'onda sonora e può creare alcuni artefatti (Blond and Buczinski, 2009).

La dispersione (scattering) rappresenta il ri-direzionamento delle onde sonore in direzioni non prevedibili a causa di superfici ruvide o materiale eterogeneo. Questo permette l'imaging ecografico dei confini dei tessuti che non sono necessariamente perpendicolari alla direzione dell'onda sonora incidente e permette inoltre l'imaging del parenchima. Questo tipo di interazione, insieme all'assorbimento, causa una perdita di energia delle onde sonore (Streeter and Step, 2007).

L'assorbimento è invece la conversione di una porzione di fascio ultrasonografico in calore, ed è la principale causa di attenuazione dell'immagine, che si verifica maggiormente nell'osso rispetto ai tessuti molli. Il riscaldamento tende ad aumentare con la maggiore intensità e frequenza delle onde sonore, ma la quantità di calore generato rimane tuttora trascurabile negli studi ecografici svolti in medicina veterinaria (Blond and Buczinski, 2009).

L'apparecchio ecografico è costituito da una sonda (trasduttore), un sistema centrale ed un monitor (Meola, 2008). Le onde sonore vengono generate dalla vibrazione di cristalli piezoelettrici contenuti nella sonda conseguente a impulsi meccanici o elettrici. A seguito della stabilizzazione dei cristalli, le onde sonore riflesse dai tessuti ritornano alla sonda sotto forma di echi ed inducono una nuova vibrazione dei cristalli, i quali emettono impulsi elettrici che vengono amplificati e trasformati in un'immagine ecografica da parte del computer (Blond and Buczinski, 2009).

Le sonde utilizzate in medicina veterinaria hanno frequenze comprese tra 2.5 e 10 MHz, ed esistono anche sonde con frequenze interscambiabili. La frequenza della sonda è direttamente proporzionale alla risoluzione dell'immagine ecografica: le sonde ad alta frequenza garantiscono una buona qualità d'immagine ma uno scarso potere di penetrazione nei tessuti, mentre il contrario vale per le sonde a bassa frequenza, che vengono infatti utilizzate, nonostante la peggiore qualità d'immagine, per gli organi toracici ed addominali nel bovino adulto, situati maggiormente in profondità (Streeter and Step, 2007). Le sonde più utilizzate in buiatria sono quelle settoriali, lineari o curvilinee (convex o

micro-convex) (Meola, 2008). La scansione lineare porta alla formazione di immagini rettangolari; la scansione convex è a tronco di cono e genera immagini più ampie rispetto alla scansione lineare; la sonda settoriale, invece, ha un campo visivo limitato rispetto alle altre, ma è utile per indagare strutture poste più in profondità (Blond and Buczinski, 2009).

La sonda genera un unico fascio di ultrasuoni che viaggia secondo una traiettoria rettilinea. Gli echi di ritorno sono costituiti dagli ultrasuoni riflessi dai tessuti, la cui intensità è direttamente proporzionale alle caratteristiche del tessuto che li ha originati (Spattini, 2008). L'apparecchio ecografico considera costante la velocità degli ultrasuoni nei diversi tessuti, e questo fa sì che all'aumentare della distanza tra la sonda e la struttura che riflette gli ultrasuoni cresca l'intervallo tra l'emissione delle onde sonore ed i relativi echi di ritorno (Meola, 2008). Ciò significa che, a velocità di propagazione costante, l'eco che viene riflesso in un tempo minore avrà percorso una distanza inferiore rispetto all'eco che ritorna alla sonda in un momento successivo. Se l'organo di interesse si trova in profondità, l'eco di ritorno risulta essere inoltre fortemente attenuato e l'immagine appare di scarsa qualità (Blond and Buczinski, 2009). Nella realtà, tuttavia, la velocità degli ultrasuoni nei tessuti molli è simile ma non costante, e questo può originare alcuni artefatti (Spattini, 2008).

Tutte le sonde hanno un punto di riferimento, definito marker, che garantisce un corretto orientamento dell'immagine ecografica. Nella maggior parte delle sonde esso è costituito da un rilievo puntiforme o allungato sulla superficie della sonda. Il marker presente sulla sonda e quello visualizzabile sul monitor devono corrispondere. Per convenzione, per ottenere immagini ecografiche standard in scansione longitudinale il marker della sonda viene posizionato in direzione craniale del paziente e appare sul lato sinistro del monitor; in scansione trasversale la sonda viene ruotata di 90° ed il marker viene orientato verso il lato sinistro del paziente (Lisciandro, 2013).

Per ecogenicità si intende il grado di brillantezza dell'immagine risultante da un fluido o da un tessuto attraversato da ultrasuoni (Blond and Buczinski, 2009). Le aree con la minore ecogenicità, quali acqua, urina, sangue e latte, appaiono nere o anecoiche, mentre quelle con un'ecogenicità media, come rene, fegato e milza, vengono visualizzate in gradazioni diverse di grigio o ipoecoiche (Streeter and Step, 2007). Le strutture caratterizzate dall'ecogenicità più elevata, invece, come grasso e tessuto connettivo fibroso, appaiono bianche o iperecoiche. In ordine di ecogenicità crescente possiamo distinguere: fluido, muscolo, corteccia renale, fegato, grasso, milza, parete vasale, osso (Blond and Buczinski, 2009). I tessuti che trasmettono la maggior parte degli echi sono ipoecogeni, e appaiono quindi più scuri nell'immagine ecografica, mentre le strutture che riflettono la maggior parte degli echi sono iperecogene, ovvero grigio-bianche (Streeter and Step, 2007).

La modalità principalmente utilizzata al giorno d'oggi per l'imaging ecografico è il B-mode (Brightness mode), che risulta essere il più intuitivo in quanto permette la formazione di un'immagine dinamica del tessuto e maggiormente correlata alla reale forma anatomica (Streeter and Step, 2007). La modalità B-mode, infatti, fornisce un'immagine bidimensionale di uno specifico piano di scansione tridimensionale di un organo o tessuto (Meola, 2008). Con questa modalità si possono percepire i diversi elementi sulla base della scala dei grigi (Blond and Buczinski, 2009).

1.3.2 Principali artefatti ecografici

Un artefatto ecografico è definibile come qualsiasi elemento presente nell'immagine ecografica che non rappresenta effettivamente la struttura indagata ma è avventizio. Gli artefatti sono costantemente presenti in ecografia, ed è necessario riconoscerli per evitare di interpretare in maniera erronea l'immagine (Spattini, 2008). Gli artefatti ecografici possono essere di diverse tipologie: quelli ambientali, legati ad esempio all'interferenza di apparecchi elettromagnetici presenti nelle vicinanze; quelli dovuti ad errori dell'operatore, come errata impostazione dell'ecografo, inadeguata preparazione del paziente o scarsa qualità d'immagine; ed infine quelli che risultano dall'interazione tra gli ultrasuoni ed il tessuto (Blond and Buczinski, 2009).

Tra quelli operatore-dipendenti, si riconoscono:

- Inadeguata preparazione del paziente. L'aria intrappolata nel pelo che riveste la cute dell'animale o la presenza di croste o sporcizia ostacolano il contatto diretto tra la sonda e la superficie cutanea, impedendo quindi l'acquisizione di buone immagini. Per evitare questo artefatto è sufficiente tosare il pelo dell'animale, ove possibile, o applicare abbondante quantità di alcol e/o gel da ecografia (Spattini, 2008).
- Errato settaggio del power o del gain. In questi casi l'errore dipende da impostazioni scorrette dello strumento, che risultano in scarsa possibilità di distinguere tessuti a ecogenicità diversa o in perdita di dettaglio (Spattini, 2008).

Per quanto riguarda gli artefatti da interazione:

- Artefatto di riverbero. Si genera quando il fascio di ultrasuoni incontra un tessuto ad impedenza acustica differente. È molto marcato se il secondo tessuto ha un'impedenza acustica inferiore, come avviene ad esempio per il gas. Questo fa sì che il fascio di ultrasuoni venga quasi completamente riflesso e ritorni alla sonda, che a sua volta ne riflette gran parte, e così via fino all'attenuazione totale degli ultrasuoni. Questo genera multiple linee

iperecogene parallele tra loro e ad equa distanza, di intensità progressivamente inferiore a causa dell'attenuazione del fascio sonoro (Blond and Buczinski, 2009).

Se le onde sonore incontrano invece piccole bolle d'aria, ciò che viene visualizzato nell'immagine ecografica è la comet tail. Questo artefatto si verifica soprattutto se vi è presenza di gas nell'intestino o in presenza di tessuto osseo (Bönhof, 2016a).

- Ombra acustica posteriore. Si verifica nelle aree situate posteriormente a tessuti fortemente riflettenti, come gas e aria, o fortemente attenuanti, quali corpi estranei e tessuto osseo, per le quali quindi non si ottiene nessuna immagine ecografica a causa della mancata propagazione del fascio di ultrasuoni (Spattini, 2008).
- Effetto specchio. Questo artefatto provoca la duplicazione di una struttura posizionandola in maniera speculare rispetto alla struttura originale. Ciò si verifica quando il fascio di ultrasuoni incontra una superficie curvilinea molto riflettente. Un esempio tipico è la duplicazione della cistifellea da un lato e dall'altro rispetto al diaframma (Spattini, 2008).
- Ombre acustiche laterali (rifrazione). Si osserva ai margini di strutture curvilinee dove si verifica la rifrazione degli ultrasuoni, che assumono quindi una direzione differente e non ritornano alla sonda sotto forma di echi riflessi, generando aree laterali di ombra (Prabhu et al., 2014).

Altri artefatti generati dall'ecografo sono:

- Artefatto del campo superficiale. Questa tipologia di artefatto è presente in gradi diversi in tutte le immagini ecografiche, ed impedisce la visualizzazione dei primissimi strati sottostanti la sonda (Spattini, 2008).
- Errore della valutazione della velocità di propagazione. Le strutture distali ad uno strato di tessuto adiposo risultano essere posizionate, nell'immagine ecografica, ad una profondità maggiore rispetto a quella a cui si trovano realmente, a causa della minore velocità di trasmissione degli ultrasuoni all'interno del grasso (Bönhof, 2016b).
- Rinforzo di parete posteriore. Le onde sonore che attraversano raccolte di liquido subiscono un'attenuazione inferiore rispetto alle onde sonore che attraversano tessuti molli. Per questo motivo i tessuti situati distalmente a raccolte di liquido appaiono iperecogeni all'ecografia (Bönhof, 2016b).
- Artefatto da volume parziale. Porta alla formazione di pseudo-sedimento nella vescica e nella cistifellea, a causa della sommatoria di strutture anecogene ed ecogene con ottenimento di immagini ad ecogenicità intermedia (Blond and Buczinski, 2009).
- Artefatto dei lobi laterali. Questo è un artefatto legato ai fasci secondari laterali emessi dalla sonda, che vengono però riconosciuti come parte del fascio principale dal computer. Di

conseguenza gli echi di ritorno dei tessuti incontrati dagli ultrasuoni secondari vengono posizionati al centro dell'immagine ecografica. Questo artefatto si verifica soprattutto in organi contenenti liquido, come vescica e cistifellea (Lisciandro, 2013).

1.3.3. Ecografia del fegato: modalità e valenza clinico-diagnostica

L'esame ecografico del fegato in un bovino adulto richiede l'utilizzo di una sonda di 2.5-3.5 MHz da apporre sul lato destro dell'animale, dal quinto al dodicesimo spazio intercostale (Streeter and Step, 2007). L'esatta posizione dell'organo varia da animale ad animale in base alla replezione dell'apparato gastro-enterico e ad un'eventuale gravidanza in corso. Tutti gli spazi intercostali vengono scansionati in direzione dorso-ventrale e caudo-craniale, concentrandosi in particolare negli spazi dal dodicesimo al decimo (Braun, 2009). La preparazione del paziente è fondamentale e prevede la rimozione del pelo dalla zona che si vuole investigare, con successiva pulizia della cute con acqua o alcol. L'applicazione successiva di alcol e/o gel per ecografia migliora il contatto tra la sonda e la cute (Streeter and Step, 2007). Successivamente l'organo viene scansionato secondo piani sagittali e trasversali con lo scopo di ricostruirne l'immagine tridimensionale (Blond and Buczinski, 2009). Nei bovini il taglio del pelo può rappresentare un problema dal punto di vista estetico ed economico, oltre ad essere svantaggioso in termini di tempo (Streeter and Step, 2007).

L'ecografia del fegato permette di visualizzarne la posizione, la dimensione e l'aspetto del parenchima, oltre alla topografia dei principali vasi. La parte craniale dell'organo è difficilmente investigabile in quanto nascosta dai lobi caudali del polmone (Braun, 2009). In condizioni fisiologiche, il pattern ecografico epatico è omogeneamente ipoecogeno e presenta un angolo acuto centrato sulla vena cava caudale. Inoltre, la profondità del fegato è di massimo 15 cm in condizioni fisiologiche (Fiore et al., 2018). Le vene epatiche sono visibili in tutto il parenchima e il loro diametro aumenta progressivamente in direzione della vena porta e della vena cava caudale, mentre il lume appare anecogeno (Streeter and Step, 2007). L'aspetto tipico della vena porta è stellato al movimento della sonda, grazie alle sue ramificazioni, e la sua parete è distinguibile da quella delle vene epatiche in quanto iperecogena. La sua posizione è ventro-laterale rispetto alla vena cava caudale, ed il suo diametro nell'ultimo e penultimo spazio intercostale è compreso tra 2.9 e 5.3 cm, e tende a diminuire in direzione craniale (Braun, 2009). La vena cava ha una posizione solitamente dorso-mediale rispetto alla vena porta ed ha una caratteristica forma triangolare in sezione, in quanto è incorporata nel solco omonimo nel fegato (Streeter and Step, 2007). La colecisti è situata sulla faccia viscerale del fegato ed è visibile ecograficamente tra il nono e l'undicesimo spazio

intercostale. Appare come una struttura piriforme e cistica, di dimensioni estremamente variabili, di aspetto anecogeno con un sottile margine iperecoico (Braun, 2009).

Figura 1.2 Aspetto ecografico del parenchima epatico e della sua vascolarizzazione (Fonte: OVUD – U.O. Ruminanti, Università degli Studi di Padova).

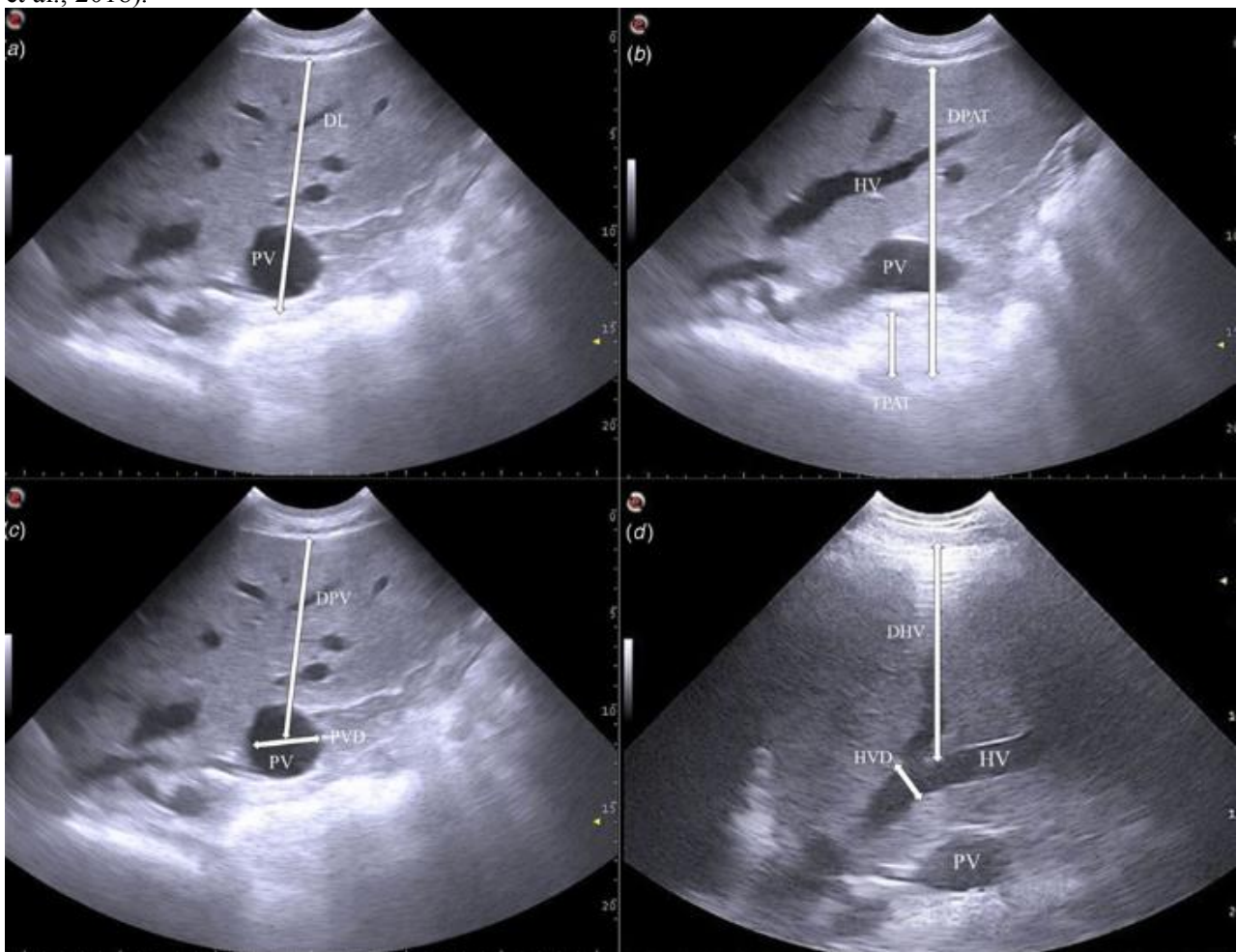


Alcune misurazioni possono essere effettuate direttamente sull'immagine ecografica, con l'aiuto di cursori, in maniera veloce e a basso costo sia in animali sani che malati. Per fare ciò, l'immagine dovrebbe essere catturata nel momento di massima inspirazione della bovina (Braun, 2009). Alcune tra le misurazioni più significative, utilizzabili per valutare eventuali alterazioni epatiche, sono la profondità del fegato e la profondità ed area della vena porta (Giannuzzi et al., 2021). La profondità del fegato (Depth of the Liver, DL) viene definita come la distanza tra il limite ventrale del muscolo intercostale interno ed il limite dorsale del tessuto adiposo periviscerale, passando attraverso il centro della vena porta. La profondità della vena porta (Depth of the Portal Vein, DPV) viene definita, invece, come la distanza tra il margine ventrale del muscolo intercostale intero ed il centro della vena. Altre misurazioni significative possono essere lo spessore e la profondità del tessuto adiposo periviscerale (Fiore et al., 2018).

I diametri della vena cava caudale e della vena porta non sembrano essere influenzati né dall'età né dalla razza della bovina, mentre sembra esserci una correlazione con la dimensione, l'altezza al garrese, la produzione di latte e lo stadio di gravidanza. La vena cava caudale, infatti, tende ad

aumentare di diametro all'avanzare della gravidanza, al contrario della vena porta, il cui diametro tende a diminuire (Braun, 2009). L'ordine di parto, invece, è direttamente proporzionale alle dimensioni del fegato, misurate come DL e DPV: bovine pluripare hanno un fegato più grande rispetto a bovine primipare (Giannuzzi et al., 2021).

Figura 1.3 Ecografia della parte dorsale del 10° spazio intercostale, lato destro della bovina. Rappresentazione delle misurazioni ecografiche del fegato: (a) profondità del fegato (DL); (b) spessore del tessuto adiposo periviscerale (TPAT) e profondità dello stesso (DPAT); (c) diametro della vena porta (PVD) e profondità della stessa (DPV); (d) diametro della vena epatica (HVD) e profondità della stessa (DHV) (Fiore et al., 2018).

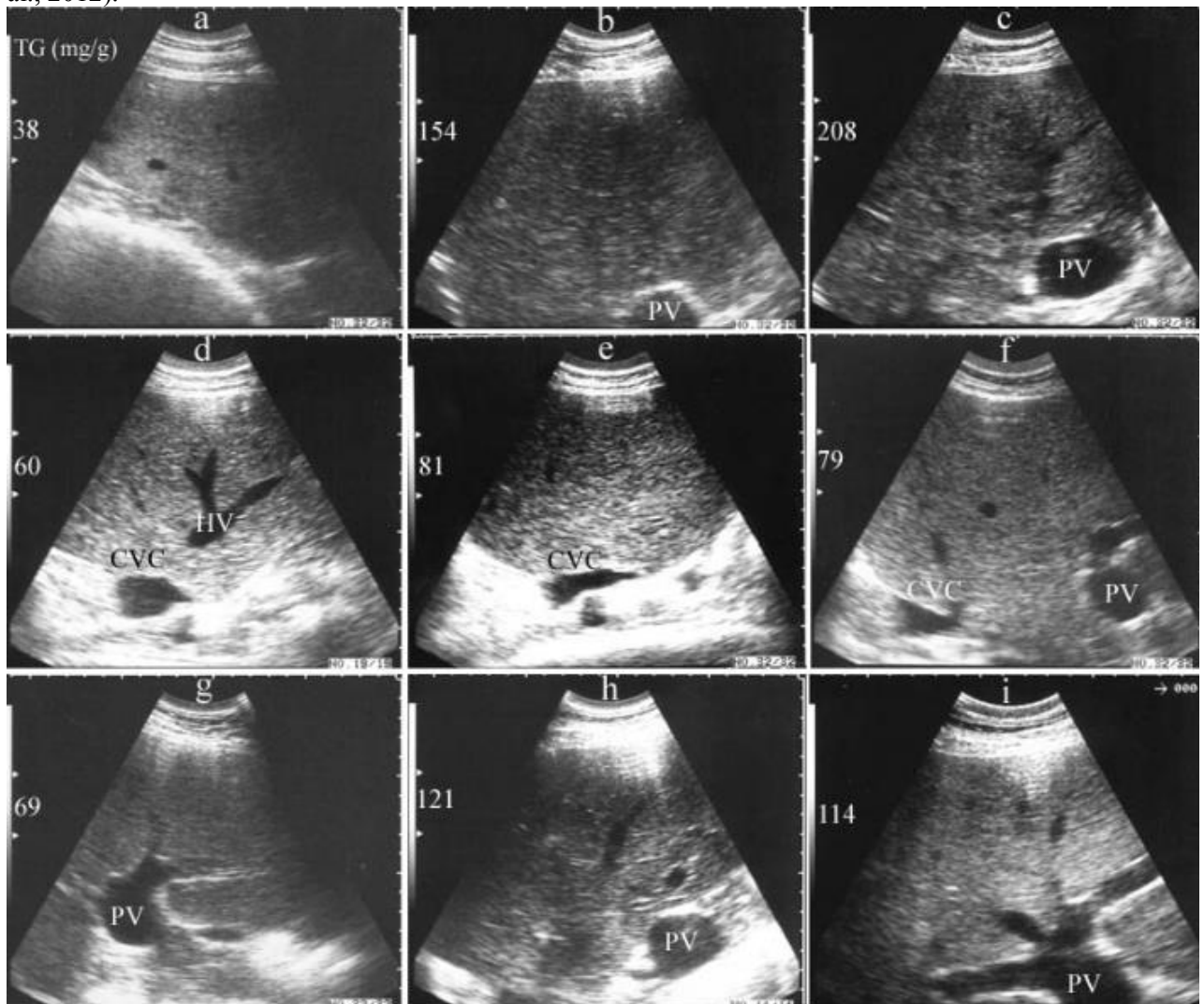


La lipidosi epatica risulta nell'aumento dell'ecogenicità e della brillantezza del parenchima, a causa dell'impedenza acustica relativamente bassa del tessuto adiposo rispetto ai tessuti molli. Il numero e l'intensità degli echi di ritorno crescono progressivamente con l'aggravarsi della condizione (Streeter and Step, 2007). Negli stadi avanzati di lipidosi, quindi, il fegato assume un aspetto iperecogeno ed è difficilmente differenziabile dai tessuti circostanti. Il contrasto tra il parenchima e i vasi diminuisce: spesso si visualizzano solo i vasi maggiori, mentre i vasi minori sono più difficili da scansionare in quanto compressi dagli epatociti ingrossati (Braun, 2009). La lipidosi può anche

portare ad una maggiore attenuazione degli echi di ritorno (Streeter and Step, 2007). Ciò è dovuto ad un'aumentata distanza tra il fegato e la parete addominale, in quanto gli epatociti contenenti TAG provocano una maggiore impedenza acustica. Il risultato è che la regione più prossima alla parete addominale risulta essere iperecoica, mentre le aree più distanti sono ipoecoiche o addirittura non scansionabili (Braun, 2009).

In corso di patologia epatica acuta e diffusa ci si aspetta, inoltre, un aumento delle dimensioni dell'organo, con una profondità del fegato superiore a 15 cm (Fiore et al., 2018).

Figura 1.4 Ecografie epatiche di tre bovine durante il periodo di transizione. Le immagini sono state ottenute 3 settimane prima della data prevista del parto (a, d, g), al parto (b, e, h), e 3 settimane dopo il parto (c, f, i). All'aumentare del contenuto epatico di TAG, nella bovina 1 (a, b, c) le immagini ecografiche mostrano un graduale aumento dell'ecogenicità e offuscamento dei vasi. Nella bovina 2 (d, e, f), l'ecogenicità aumenta al momento del parto e diminuisce 3 settimane dopo, seguendo parallelamente il contenuto di TAG. Nella bovina 3 (g, h, i), l'ecogenicità del fegato aumenta all'aumentare del contenuto epatico di TAG (Tharwat et al., 2012).



Considerando i limiti dell'applicazione della biopsia epatica in campo, l'ecografia transcutanea rappresenta una tecnica promettente per predire e diagnosticare il rischio di sviluppo di lipidosi epatica in bovine da latte ad alta produzione (Fiore et al., 2018). La concentrazione di lipidi a livello epatico dopo il parto, infatti, è un indicatore della mobilizzazione che avviene durante il periodo di transizione, e rappresenta quindi un marker utile per capire il carico metabolico della bovina in quel momento (Weber et al., 2013). Questa tecnica presenta comunque delle limitazioni. Va sottolineato, infatti, che l'ecografia è un metodo sensibile per la valutazione di cambiamenti a carico del parenchima ma poco specifico, e richiede quindi spesso il campionamento della lesione scansionata per studi citologici per arrivare ad una diagnosi conclusiva (Blond and Buczinski, 2009). L'ecografia presenta dei limiti intrinseci legati alla difficoltà di rilevare minimi cambiamenti nella texture epatica e alle differenze nelle caratteristiche ed impostazioni della sonda utilizzata. Inoltre le alterazioni metaboliche, tra cui la lipidosi, provocano minimi cambiamenti nella texture epatica che possono essere impercettibili ad una prima valutazione, ed essere quindi difficilmente rilevabili basandosi unicamente sull'osservazione (Giannuzzi et al., 2021).

D'altra parte, la valutazione visiva della brillantezza del tessuto epatico nell'immagine ecografica rimane un metodo diagnostico soggettivo che, presentando una elevata variabilità inter- ed intra-osservatore, non permette di raggiungere elevati livelli di affidabilità dei risultati (Tharwat et al., 2012). Perciò la valutazione visiva in ecografia può essere utilizzata solamente per una stima approssimativa del contenuto lipidico epatico. Per ottenere maggiore accuratezza, le impostazioni e la tecnica dell'esame ecografico in sé dovrebbero essere standardizzate (Starke et al., 2010).

Per superare questi limiti, sono stati sviluppati alcuni metodi quantitativi che sono in grado di estrarre le informazioni rilevanti dalle immagini ecografiche. Uno di questi è la texture analysis, ovvero una tecnica che analizza il contenuto di TAG nel fegato, stimato sulla base delle immagini ecografiche, come indicatore per la lipidosi epatica nelle bovine da latte (Starke et al., 2010). Lo scopo della texture analysis è aumentare la quantità di informazioni ottenibili dall'ecografia e superare il limite dell'occhio umano nel distinguere gradazioni diverse di grigio (Banzato et al., 2016). È stato dimostrato che l'analisi quantitativa digitale delle immagini ecografiche aumenta l'accuratezza nella rilevazione di lipidosi epatica nella bovina da latte (Bobe et al., 2008).

Alcuni studi hanno inoltre esplorato i benefici dell'utilizzare le misurazioni epatiche delle dimensioni dell'organo e delle strutture anatomiche correlate, come DL, DPV e diametro della vena porta, per diagnosticare una condizione di lipidosi (Fiore et al., 2018).

2. Obiettivi della tesi

Tale studio è collocato all'interno del progetto di ricerca "Gestione sanitaria delle patologie peripartali nella bovina da latte: individuazione di parametri diagnostici predittivi", finanziato da fondi di ricerca B.I.R.D. 2022 dell'Università degli Studi di Padova.

Lo scopo principale di questo studio è stato quello di valutare le variazioni biochimiche ed ecografiche in bovine clinicamente sane durante il periodo di transizione.

Partendo da tali premesse, gli obiettivi che si è posto questo studio sono stati:

1. Valutare le variazioni para-fisiologiche dei principali parametri biochimici durante il periodo di transizione;
2. Valutare l'associazione tra i principali parametri biochimici e lo stato di salute epatica;
3. Valutare le variazioni del contenuto lipidico e delle misurazioni epatiche durante il periodo di transizione;
4. Individuare le possibili associazioni tra il grado di contenuto lipidico e le misurazioni epatiche con lo stato di salute del fegato;
5. Verificare l'applicabilità dell'ecografia epatica come mezzo di screening e monitoraggio della lipidosi epatica.

Tale metodica potrebbe configurarsi come un valido aiuto per il medico veterinario aziendale, non solo per una migliore comprensione delle variazioni fisiologiche o indicative di patologia metabolica in bovine da latte durante il periodo di transizione, ma anche per una puntuale e tempestiva diagnosi, determinando un miglioramento del benessere animale e della gestione della mandria da parte dell'allevatore.

3. Materiali e metodi

Il presente studio è stato approvato dall'Organismo Preposto al Benessere degli Animali dell'Università degli Studi di Padova (Numero di Protocollo 81/2022). La gestione degli animali e le diverse procedure sono state condotte in accordo con la Guida per la Cura e l'Utilizzo di Animali da Laboratorio e la Direttiva 2010/63/EU per gli esperimenti scientifici su animali (Legge Nazionale: D.lgs. 26/2014). Inoltre, gli allevatori sono stati precedentemente informati ed erano in accordo con gli obiettivi dello studio e con i metodi utilizzati.

3.1 Disegno sperimentale

La prova si è svolta tra i mesi di marzo e maggio 2022 in 6 allevamenti bovini di razza Frisona Italiana ad alta produttività situati nel territorio della regione Veneto, nella provincia di Vicenza.

Tutte le aziende presentavano un sistema di stabulazione libera, alimentazione tramite unifeed distribuito due volte al giorno ed acqua ad libitum. La gestione aziendale prevedeva un periodo di asciutta di durata pari a 60 giorni.

Tutti gli animali in asciutta ed entro due settimane dal parto previsto sono stati sottoposti a visita clinica prima di ogni procedura. Gli animali che presentavano segni clinici di patologie metaboliche sono stati esclusi dalla prova. Di questi animali, 76 bovine sono state selezionate in modo randomico dal gruppo sia di primipare che di pluripare.

Il disegno sperimentale applicato in questo studio è stato di tipo longitudinale. Tutti gli animali reclutati sono stati valutati in tre tempistiche durante il periodo di transizione: la prima valutazione è stata svolta a 7 ± 3 giorni preparto (T0) considerando la data prevista del parto; la seconda valutazione è stata svolta a 7 ± 3 DIM (T1); la terza ed ultima valutazione è stata svolta a 21 ± 3 DIM (T2).

In ciascuna tempistica (T0, T1, T2) sono stati eseguiti: la valutazione del BCS (Edmonson et al., 1989); un campionamento ematico da sottoporre ad analisi biochimica; ed un esame ecografico trans-addominale del fegato.

3.1.1 Campionamento ematico ed analisi biochimica

Il campionamento ematico è stato eseguito dalla vena coccigea tramite sistema vacutainer (VACUETTE®) ed utilizzando provette contenenti anticoagulante (9 ml Litio Eparina Greiner Bio-One S.r.l, Italia) per le analisi di biochimica su plasma. Per ogni animale sono state prelevate 2

provette che sono state successivamente refrigerate a 4°C e trasportate alla stessa temperatura con un freezer portatile (CoolFreeze CFX65 W professionale, Dometic, Stoccolma, Svezia - temperatura minima -22 °C) entro un'ora dal prelievo all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), sede di Legnaro. I campioni sono stati quindi centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti mediante centrifuga (Heraeus Labofouge 400, Thermo Scientific, Milano, Italia) per ottenere il plasma. Un totale di 4 aliquote è stato stoccato per ogni animale in eppendorf della capacità di 1.5 mL a -20°C. Su un'aliquota di plasma di ogni animale e per ogni tempo di valutazione (T0, T1, e T2) è stata eseguita un'analisi biochimica mediante un analizzatore multi-parametrico (Cobas C501, Roche Diagnostics, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) per la quantificazione dell'aspartato aminotransferasi (AST; UI/L), della bilirubina totale (BIL.T., mg/dL), dei NEFA (mEq/L) e del BHB (mmol/L). In particolar modo, la quantificazione dei NEFA è stata eseguita tramite test con metodo colorimetrico (NEFA RX Monza test; Randox, Milano, Italia), mentre il BHB è stato valutato tramite test di cinetica enzimatica (Randox, Milano, Italia).

3.1.2 Indagine ecografica

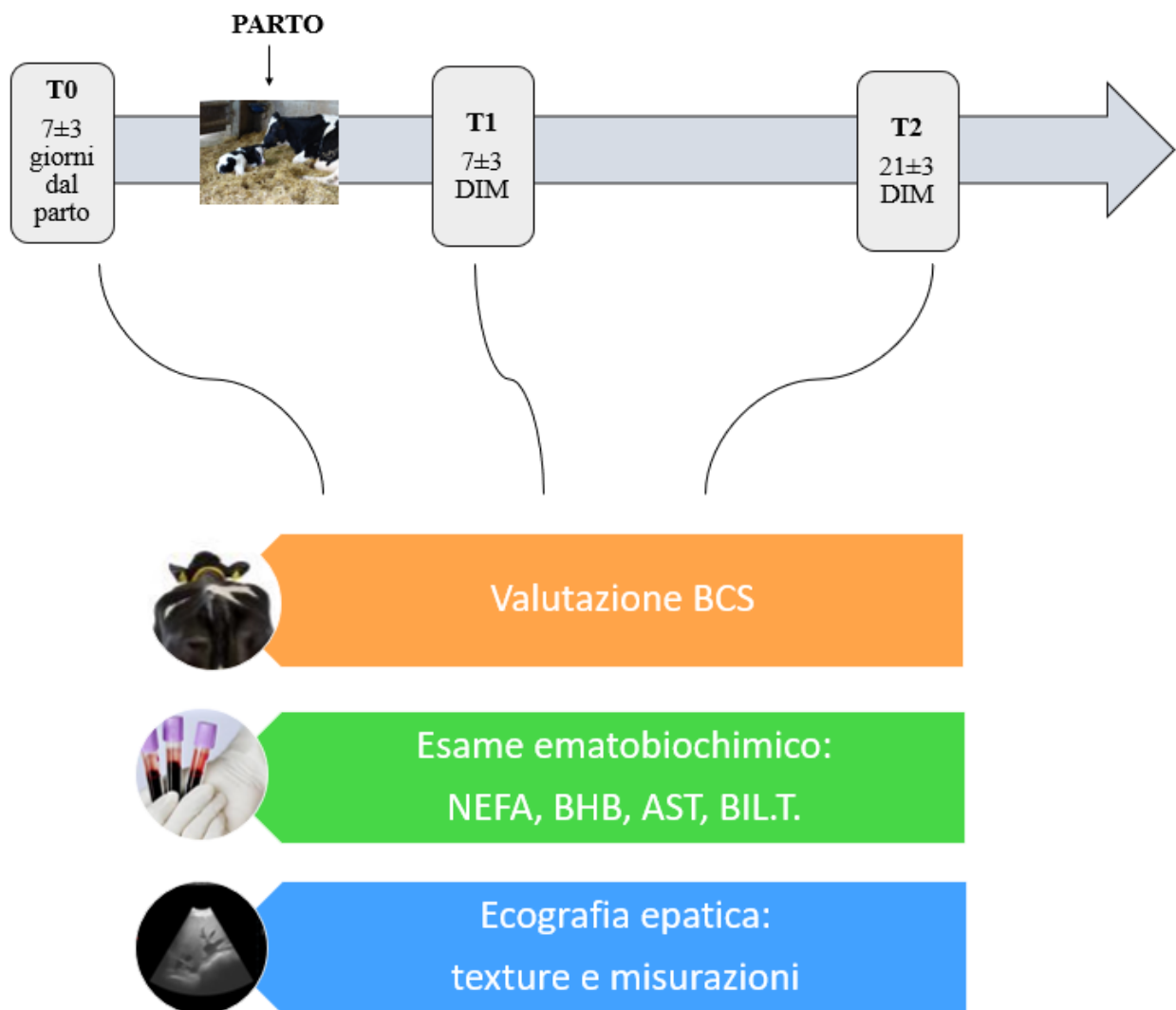
L'esame ecografico è stato eseguito sul lato destro dell'animale a livello del decimo spazio intercostale tramite l'utilizzo dello scanner ecografico portatile Mylab™ OneVET (ESAOTE S.p.A., Genova, Italia) equipaggiato di una sonda convex a multifrequenza (Animal Science Probe, SC3421 2.5-6.6 MHz; ESAOTE S.p.A., Genova, Italia).

Per ogni ecografia sono state mantenute le stesse impostazioni per la scansione epatica: 2.5 MHz di frequenza, 26 cm di profondità, guadagno massimo, e tempo-guadagno in posizione neutrale (Banzato et al., 2016). L'area selezionata per l'esame ultrasonografico, sul lato destro dell'animale tra gli spazi intercostali, è stata pulita e bagnata con alcool etilico al 90% come agente trasducente. La sonda è stata poi spostata dorso-ventralmente per un'ampiezza di circa 15 cm nello spazio intercostale. Il fegato è stato esaminato per la presenza di lesioni focali, compresi ascessi, masse neoplastiche o infiltrazioni lipidiche anomale. Le immagini ecografiche multiple sono state archiviate in formato medico senza compressione (DICOM) per ulteriori analisi.

Successivamente, per ciascun animale e tempo di valutazione sono state eseguite le misurazioni della profondità del fegato (DL, mm), del diametro della vena porta (PVD, mm), dell'area della vena porta (PVA, cm²) e della profondità della vena porta (DPV, mm) (Fiore et al., 2018) tramite software MyLab Desk (ESAOTE S.p.A., Genova, Italia). Inoltre, è stata eseguita una valutazione della texture del parenchima epatico tramite il software di analisi MaZda versione 4.6 (Technical University of Lodz, Institute of Electronics, Polonia) per stimare il contenuto lipidico del fegato (TAG, mg/g) grazie alla formula già comparata al gold standard della biopsia epatica e sviluppata sullo scanner

portatile Mylab OneVET (Banzato et al., 2016). L'analisi è stata svolta secondo le indicazioni dello sviluppatore del software (co-occurrence matrix: 6 bits/pixel, gradient features: 8 bits/pixel, run-length matrix: 4 bits/pixel, wavelet transform: 12 bits/pixel). Per minimizzare gli effetti sia della luminosità eccessiva che delle variazioni di contrasto delle immagini sul risultato dell'analisi della texture, è stata calcolata con MaZda una normalizzazione dell'istogramma del livello di grigio facendo rientrare i dati dell'istogramma in $\mu \pm 3\sigma$ (μ : media del livello di grigio; σ : deviazione standard del livello di grigio) (Banzato et al., 2016).

Figura 3.1 Rappresentazione schematica del disegno sperimentale.



3.2 Suddivisione degli animali in gruppi

Dei 76 animali reclutati, 7 non presentavano i dati biochimici per tutti i tempi di valutazione e sono stati pertanto esclusi.

Successivamente, sulla base dei parametri biochimici NEFA e AST misurati in T1 e dei relativi cutoff di riferimento indicati in letteratura (rispettivamente Ospina et al., 2010; Cao et al., 2017) gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi:

- Gruppo sano (GR1): 25 animali della prova presentanti valori di NEFA inferiori a 0.57 mEq/L e di AST inferiori a 100 UI/L.
- Gruppo con sospetto di danneggiamento epatico (GR2): 21 bovine presentanti concentrazioni di NEFA inferiori a 0.57 mEq/L e di AST superiori a 100 UI/L.
- Gruppo con lipomobilizzazione (GR3): 5 bovine presentanti valori di NEFA superiori a 0.57 mEq/L e di AST inferiori a 100 UI/L.
- Gruppo con sospetta lipidosi (GR4): 18 animali presentanti concentrazioni di NEFA superiori a 0.57 mEq/L e di AST superiori a 100 UI/L.

Tabella 3.1 Suddivisione degli animali della prova in gruppi sulla base di due parametri biochimici (NEFA, AST) valutati in T1, e dei relativi cutoff indicati in letteratura (Ospina et al., 2010; Cao et al., 2017).

GRUPPI IN T1	NEFA (mEq/L)	AST (UI/L)	N° ANIMALI
GR1 (sano)	< 0.57	< 100	25
GR2 (danno epatico)	< 0.57	> 100	21
GR3 (lipomobilizzazione)	> 0.57	< 100	5
GR4 (lipidosi)	> 0.57	> 100	18

3.3 Analisi statistica

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il pacchetto "rcomdr" del software R versione 4.2.3 (R Core Team, 2018). Prima di procedere con l'analisi statistica è stata valutata la distribuzione dei dati tramite il test di normalità Shapiro-Wilk ed il test delle varianze Levene.

L'analisi statistica è stata svolta secondo un'ANOVA a due vie con modello statistico misto (mixed model). Tale modello utilizzava come fattori fissi l'effetto gruppo, tempo, e la loro interazione; come fattore randomico e ripetuto sono stati utilizzati gli effetti azienda ed animale.

Successivamente, l'analisi a coppie delle differenze interparametriche delle medie dei minimi quadrati è stata eseguita secondo il metodo Bonferroni. In generale, è stato accettato un limite di significatività di $P \leq 0.05$.

4. Risultati

I risultati ottenuti dall'esame biochimico ed il BCS sono riportati nella Tabella 4.1.

Tabella 4.1 Andamento dei parametri metabolici nei tre tempi (T0, T1, T2). Gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi sulla base dei valori di NEFA e AST in T1.

Parametro	Gruppo ¹	T0 (7±3 gg parto)	T1 (7±3 gg post-partum)	T2 (21±3 gg post-partum)	SEM ²	p-values		
						Gruppo	Tempo	Interazione
NEFA (mEq/L)	GR1	0.21 ^{a,x}	0.34 ^{b,x}	0.32 ^{b,x}	0.04	0.555	0.0009	<0.0001
	GR2	0.17 ^{a,x}	0.38 ^{b,x}	0.33 ^{b,x}	0.05			
	GR3	0.29 ^{a,x}	0.68 ^{b,y}	0.44 ^{c,x}	0.09			
	GR4	0.24 ^{a,x}	1.05 ^{b,z}	0.44 ^{c,x}	0.05			
BHB (mmol/L)	GR1	0.59 ^{a,x}	0.83 ^{b,x}	0.78 ^{b,x}	0.08	0.978	0.05	<0.0001
	GR2	0.59 ^{a,x}	0.84 ^{b,x}	0.75 ^{b,x}	0.09			
	GR3	0.54 ^{a,x}	0.75 ^{b,x}	0.84 ^{b,x}	0.18			
	GR4	0.63 ^{a,x}	1.61 ^{b,y}	1.01 ^{c,y}	0.10			
AST (UI/L)	GR1	64.70 ^{a,x}	81.00 ^{b,x}	74.30 ^{ab,x}	7.36	0.96	0.001	0.004
	GR2	64.40 ^{a,x}	107.00 ^{b,y}	87.40 ^{c,x}	8.13			
	GR3	56.50 ^{a,x}	85.40 ^{b,x}	84.60 ^{b,x}	16.05			
	GR4	65.80 ^{a,x}	160.10 ^{b,z}	119.30 ^{c,y}	8.99			
BIL.T. (mg/dL)	GR1	2.53 ^{a,x}	3.03 ^{a,x}	2.69 ^{a,x}	0.35	0.984	0.692	<0.0001
	GR2	2.65 ^{a,x}	3.10 ^{a,x}	2.90 ^{a,x}	0.39			
	GR3	2.79 ^{a,x}	3.13 ^{a,x}	2.89 ^{a,x}	0.77			
	GR4	2.68 ^{a,x}	7.87 ^{b,y}	3.70 ^{a,x}	0.43			
BCS ³ (/5)	GR1	3.50 (3.44-4.00) ^{a,x}	3.25 (3.00-3.75) ^{ab,x}	3.00 (2.75-3.25) ^{b,x}	/	0.5	0.002	0.7411
	GR2	3.50 (3.25-2.75) ^{a,x}	3.25 (3.00-3.31) ^{b,x}	3.00 (2.88-3.25) ^{b,x}	/			
	GR3	3.75 (3.25-3.75) ^{a,x}	3.25 (2.94-3.56) ^{b,x}	3.38 (3.13-3.56) ^{b,x}	/			
	GR4	3.50 (3.25-3.75) ^{a,x}	3.25 (3.00-3.50) ^{b,x}	3.00 (2.75-3.38) ^{b,x}	/			

¹ GR1 (sano, n=25): NEFA < 0.57 mEq/L; AST < 100 UI/L.

GR2 (sospetto danneggiamento epatico, n=21): NEFA < 0.57 mEq/L; AST > 100 UI/L.

GR3 (lipomobilizzazione, n=5): NEFA > 0.57 mEq/L; AST < 100 UI/L.

GR4 (sospetta lipidosi, n=18): NEFA > 0.57 mEq/L; AST > 100 UI/L.

² Errore standard delle medie (Standard Error of Means).

³ Per il BCS, nella casella viene riportata la mediana e tra parentesi il range interquartile.

Il valore riportato all'interno della casella rappresenta la media (NEFA, BHB, AST, BIL.T.) o la mediana (BCS) delle misurazioni di un determinato parametro per un determinato gruppo all'interno di un tempo. Le lettere a-c indicano le variazioni significative entro riga; le lettere x-z indicano le variazioni significative entro colonna.

Per quanto riguarda le concentrazioni di NEFA, in tutti i gruppi si osservavano valori più elevati a T1 rispetto a T0. Nel passaggio da T1 a T2 non è stata evidenziata alcuna differenza significativa per GR1 e GR2, ma GR3 e GR4 presentavano valori inferiori a T2 rispetto a T1. Nei tempi T0 e T2 non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi; i gruppi GR3 e GR4 presentavano valori superiori rispetto a GR1 e GR2 a T1, con il gruppo GR4 che presentava la concentrazione di NEFA maggiore.

Le concentrazioni di BHB, invece, mostravano a T1 valori superiori rispetto a T0 in tutti i gruppi. Nel passaggio da T1 a T2, invece, non sono state evidenziate differenze per GR1, GR2 e GR3. Per GR4, invece, si è osservato a T2 un valore inferiore ma comunque maggiore del valore a T0 dello stesso gruppo. Al tempo T0 non vi era alcuna differenza statisticamente significativa tra i gruppi; a T1 e T2, invece, il gruppo GR4 presentava concentrazioni maggiori rispetto agli altri gruppi. Inoltre, il gruppo GR4 presentava concentrazioni plasmatiche di BHB superiori a 1.0 mmol/L sia in T1 che in T2.

Per quanto riguarda le concentrazioni di AST, tutti i gruppi hanno mostrato valori maggiori a T1 rispetto a T0. GR1 e GR3 non hanno mostrato differenze nel passaggio da T1 a T2; al contrario GR2 e GR4 hanno evidenziato valori inferiori nell'ultimo tempo post-partum (T2) rispetto al precedente campionamento effettuato in T1. Al tempo T2 GR4 presentava concentrazioni maggiori rispetto agli altri gruppi. A T0, invece, non si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra i gruppi. A T1 GR2 e GR4 differivano tra loro e da GR1 e GR3; a T2 GR4 presentava differenze significative rispetto agli altri tre gruppi.

Per quanto riguarda i livelli di BIL.T., GR1, GR2 e GR3 non hanno mostrato differenze entro gruppo ed entro tempo. Il gruppo GR4, invece, presentava valori più elevati a T1 rispetto a T0 e T2, senza però mostrare differenze significative tra T2 e T0 e rispetto agli altri gruppi.

Considerando il BCS, si è osservato come i valori a T1 e a T2 fossero tendenzialmente inferiori rispetto a T0, senza tuttavia evidenziare differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi entro tempo.

I risultati dell'indagine ecografica epatica sono riportati nella tabella 4.2.

Tabella 4.2 Andamento delle misurazioni ecografiche nei tre tempi (T0, T1, T2). Gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi sulla base dei valori di NEFA e AST in T1.

Parametro	Gruppo ¹	T0 (7±3 gg preparto)	T1 (7±3 gg post-partum)	T2 (21±3 gg post-partum)	SEM ²	p-values		
						Gruppo	Tempo	Interazione
TAG (mg/g)	GR1	38.60 ^{a,x}	37.30 ^{a,x}	40.10 ^{a,x}	1.90	0.719	0.7	0.05
	GR2	39.60 ^{a,x}	37.90 ^{a,x}	37.60 ^{a,x}	2.05			
	GR3	42.20 ^{a,x}	32.90 ^{b,y}	39.40 ^{a,x}	3.98			
	GR4	41.40 ^{a,x}	39.70 ^{a,x}	45.20 ^{b,y}	2.28			
PVD (mm)	GR1	32.10 ^{a,x}	33.10 ^{a,x}	35.90 ^{b,x}	1.07	0.241	<0.0001	0.098
	GR2	29.80 ^{a,x}	35.80 ^{b,y}	35.60 ^{b,x}	1.15			
	GR3	28.30 ^{a,x}	34.40 ^{b,y}	38.20 ^{c,y}	2.24			
	GR4	31.60 ^{a,x}	36.60 ^{b,y}	37.50 ^{b,xy}	1.29			
PVA (cm ²)	GR1	7.62 ^{a,x}	8.71 ^{ab,x}	10.29 ^{b,x}	0.51	0.309	0.0006	0.251
	GR2	7.51 ^{a,x}	9.77 ^{b,y}	10.14 ^{b,x}	0.55			
	GR3	6.27 ^{a,x}	9.39 ^{b,y}	11.50 ^{b,x}	1.07			
	GR4	7.85 ^{a,x}	10.25 ^{b,y}	11.10 ^{b,x}	0.62			
DPV (mm)	GR1	115.00 ^{a,x}	120.00 ^{a,x}	125.00 ^{ab,x}	3.32	0.64	0.008	0.089
	GR2	116.00 ^{a,x}	127.00 ^{ab,x}	123.00 ^{a,x}	3.62			
	GR3	121.00 ^{a,x}	137.00 ^{b,y}	133.00 ^{b,y}	7.00			
	GR4	121.00 ^{a,x}	125.00 ^{ab,x}	127.00 ^{ab,x}	4.01			
DL (mm)	GR1	151.00 ^{a,x}	157.00 ^{a,x}	163.00 ^{ab,x}	3.83	0.663	0.24	0.055
	GR2	157.00 ^{a,x}	162.00 ^{ab,x}	162.00 ^{ab,x}	4.15			
	GR3	158.00 ^{a,x}	175.00 ^{b,y}	179.00 ^{b,y}	8.04			
	GR4	156.00 ^{a,x}	171.00 ^{b,y}	174.00 ^{b,y}	4.62			

¹ GR1 (sano, n=25): NEFA < 0.57 mEq/L; AST < 100 UI/L.

GR2 (sospetto danneggiamento epatico, n=21): NEFA < 0.57 mEq/L; AST > 100 UI/L.

GR3 (lipomobilizzazione, n=5): NEFA > 0.57 mEq/L; AST < 100 UI/L.

GR4 (sospetta lipidosi, n=18): NEFA > 0.57 mEq/L; AST > 100 UI/L.

² Errore standard delle medie (Standard Error of Means).

Il valore riportato all'interno della casella rappresenta la media delle misurazioni di un determinato parametro per un determinato gruppo all'interno di un tempo. Le lettere a-c indicano le variazioni significative entro riga; le lettere x-z indicano le variazioni significative entro colonna.

Le concentrazioni di TAG riscontrate nei gruppi GR1 e GR2 non hanno subito variazioni statisticamente significative nel corso del tempo della prova. GR3 presentava a T1 un valore inferiore rispetto a T0, ma non vi era differenza significativa tra i valori di TAG riscontrati a T0 ed a T2. GR4 presentava a T2 un valore superiore rispetto a T1, ma non vi era differenza significativa tra i valori di TAG riscontrati a T0 ed a T1. Al tempo T0 non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa tra i gruppi. Nel tempo T1 GR3 differiva dagli altri gruppi; nel tempo T2 GR4 differiva dagli altri tre gruppi.

Per quanto riguarda il PVD, non è stata evidenziata alcuna differenza significativa tra gruppi nel tempo T0. GR1 non ha mostrato differenze nel passaggio da T0 a T1, mentre GR2, GR3 e GR4 hanno manifestato un aumento del valore a T1. Nel passaggio da T1 a T2 i valori di GR2 e GR4 non hanno mostrato differenze al contrario di GR1 e GR3, nei quali si riscontrava un aumento del valore di PVD. Al tempo T1, quindi, si poteva osservare una differenza statisticamente significativa di GR1 rispetto agli altri gruppi; a T2 GR3 presentava differenze significative rispetto a GR1 e GR2 ma tendenzialmente non da GR4.

I valori della PVA hanno mostrato tendenzialmente un aumento per tutti i gruppi nel passaggio da T0 a T1, senza evidenziare ulteriori variazioni significative nel passaggio da T1 a T2. Non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa tra i vari gruppi a T0 ed a T2; a T1, invece, GR1 differiva dagli altri tre gruppi.

Considerando la DPV, tendenzialmente non vi era differenza nel tempo per i vari gruppi ad eccezione di GR3, che ha manifestato un aumento del valore a T1 rispetto a T0, senza ulteriori differenze significative nel passaggio da T1 a T2. Al tempo T0 non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa tra i gruppi; sia a T1 che a T2, invece, GR3 differiva dagli altri gruppi. Per quanto riguarda la DL, GR1 e GR2 tendenzialmente non hanno mostrato differenze al passare del tempo. GR3 e GR4 evidenziavano un aumento dei rispettivi valori tra T0 e T1. Al tempo T0 non è stato possibile evidenziare alcuna differenza statisticamente significativa tra i diversi gruppi. Sia a T1 che a T2 i gruppi GR3 e GR4 non presentavano differenze significative tra di loro ma differivano da GR1 e GR2.

5. Discussione

5.1 Associazione tra parametri metabolici e stato di salute del fegato

Il periodo di transizione ha un'importanza fondamentale all'interno del ciclo produttivo della bovina da latte, in quanto rappresenta la fase di maggiore insorgenza ed incidenza di patologie metaboliche ed infettive, quali chetosi, lipidosi, metrite ed altri disordini riproduttivi, dislocazione abomasale, ipocalcemia e mastite (Mulligan and Doherty, 2008). L'incidenza della maggior parte di queste patologie è frequentemente sottostimata negli allevamenti, in quanto un adeguato processo di screening della mandria con lo scopo di rilevare patologie subcliniche è spesso mancante, con conseguenti gravi perdite economiche per le aziende (Cainzos et al., 2022). Negli ultimi decenni è stato dimostrato come il NEB al quale l'animale va incontro durante il periodo di transizione rappresenti un adattamento para-fisiologico dell'animale alle elevate esigenze energetiche imposte dal parto e dalla successiva lattazione. Tuttavia, uno scarso adattamento della bovina a questo periodo può favorire l'insorgenza di problematiche sistemiche, in primis metaboliche (Bertoni et al., 2008; Giannuzzi et al., 2021). Per questo motivo, la valutazione dei principali parametri biochimici caratteristici del periodo di transizione rappresenta un metodo minimamente invasivo ed ormai affermato per investigare la risposta delle bovine alla transizione e diagnosticare patologie cliniche o subcliniche, in particolare chetosi e lipidosi epatica (Ospina et al., 2010).

Uno degli obiettivi di questo studio era la valutazione delle variazioni para-fisiologiche dei principali parametri biochimici durante la transizione. I NEFA ed il BHB sono i principali parametri ematici indicativi del NEB. Infatti, i NEFA sono indicatori della mobilitazione delle riserve corporee che riflettono la lisi dei trigliceridi contenuti nel tessuto adiposo, mentre il BHB è un indicatore della produzione di corpi chetonici in seguito a parziale β -ossidazione degli acidi grassi (LeBlanc, 2010). I NEFA sono indicatori più precisi del bilancio energetico nel periodo che precede il parto, mentre il BHB è un indicatore più accurato per valutare il bilancio energetico dell'animale dopo il parto (Elshafey et al., 2023). I risultati ottenuti nel presente studio sono in accordo con la letteratura precedente per quanto riguarda l'aumento delle concentrazioni di NEFA e BHB nel passaggio dall'ultima settimana preparto (T0) ai primi 7 giorni dalla data effettiva del parto (T1). Questo fenomeno, osservato in tutti i quattro gruppi di animali coinvolti in questo studio, riflette la difficoltà che la bovina da latte attraversa nell'adattarsi ad una condizione di NEB, in particolar modo nel periodo immediatamente precedente e successivo al parto (Cozzi et al., 2011; Angeli et al., 2019a),

ed è collegato ad un maggiore rischio di sviluppo di patologie a causa del sospetto effetto negativo di questi metaboliti sulle cellule immunitarie (Arshad and Santos, 2022). L'aumento delle concentrazioni di BHB rilevato in tutti i gruppi nel passaggio dal parto al primo post-partum, in particolare, è indicativo del processo di β -ossidazione che ha luogo nel fegato in risposta alle elevate concentrazioni ematiche di NEFA a seguito della lisi del tessuto adiposo corporeo (Aschenbach et al., 2010). La successiva stabilizzazione o riduzione dei valori di NEFA e BHB rilevate a T2 potrebbero essere indicative, invece, del progressivo ritorno di questi parametri ai livelli fisiologici, parallelamente alla risoluzione del NEB da parte dell'animale. Secondo Horst et al. (2021), infatti, il valore più basso di DMI viene rilevato solitamente verso i 10 DIM, con un successivo ritorno ad un bilancio energetico positivo per la bovina tra i 30 e i 100 DIM.

I cutoff utilizzati nel presente studio per valutare le concentrazioni di NEFA post-partum sono stati tratti dall'articolo di Ospina et al. (2010), il quale ha evidenziato delle soglie critiche per predire lo sviluppo di disordini metabolici durante la transizione: ≥ 0.29 mEq/L per il periodo parto; ≥ 0.57 mEq/L per il periodo post-partum. Osservando i risultati ottenuti nel presente studio, a T0 GR3 presentava in media concentrazioni di NEFA pari a 0.29 mEq/L, ma nessun altro gruppo di animali superava la soglia prestabilita per il parto. Nel secondo post-partum (T2), invece, nessun gruppo superava il cutoff indicato da Ospina et al. (2010). Per quanto riguarda le concentrazioni di BHB, i cutoff comunemente citati in letteratura per definire nel post-partum una condizione di chetosi subclinica variano tra 1.0 mmol/L, 1.2 mmol/L e 1.4 mmol/L (Loiklung et al., 2022). Nel presente studio GR4 mostrava concentrazioni di BHB superiori a 1.4 mmol/L in T1 ed a 1.00 mmol/L in T2. Per questo gruppo, per il quale si è ipotizzata una condizione di lipidosi epatica sulla base dei valori di NEFA e AST, si può quindi parlare di chetosi subclinica. È interessante osservare come sia GR3 che GR4 presentassero concentrazioni di NEFA superiori a 0.57 nel primo post-partum (T1), ma come solo GR4 fosse classificabile come gruppo caratterizzato da chetosi in entrambi i momenti di campionamento post-partum. Il riscontro di differenze statisticamente significative tra GR4 e i primi tre gruppi relativamente alle concentrazioni di BHB nel post-partum sembra confermare quanto comunemente indicato in letteratura riguardo l'utilizzo del BHB ematico come indicatore accurato per la distinzione di animali sani da animali affetti da chetosi (González et al., 2011; Wankhade et al., 2017). Livelli elevati di NEFA e BHB nel primo post-partum riflettono il verificarsi di un certo grado di chetogenesi ed infiltrazione lipidica nel fegato a causa dell'intenso processo di mobilizzazione che ha luogo durante la transizione (Andjelić et al., 2022). Si può supporre che i valori più elevati di NEFA e BHB rilevati nel post-partum in GR4 siano, quindi, legati alla maggiore mobilizzazione delle riserve corporee che si è verificata in questi animali, e che è risultata in concentrazioni conseguentemente più elevate di NEFA, rilevabili sia nel circolo ematico che nel

fegato. In quest'organo, inoltre, in presenza di eccessive quantità di NEFA si assiste ad una maggiore produzione di corpi chetonici e allo stoccaggio intra-epatico di lipidi sotto forma di trigliceridi (White, 2015), oltre a possibili fenomeni di lipotossicità (Bobe et al., 2004).

La valutazione della condizione corporea delle bovine nel presente studio, invece, ha evidenziato valori inferiori nel post-partum rispetto al parto in tutti i gruppi di animali. Un valore di BCS pari a massimo 3.5/5 è considerato ottimale per il periodo di transizione, in quanto permette di massimizzare la produzione di latte successiva e ridurre il rischio di insorgenza di patologie come conseguenza di over-conditioning e di una maggiore suscettibilità allo stress ossidativo che si verifica durante questa fase (Laubenthal et al., 2018; Rupprechter et al., 2018). I livelli di BCS riscontrati in questo studio non si sono distaccati eccessivamente da questo valore, e ciò conferma la corretta selezione di bovine sane effettuata prima di iniziare il campionamento per la presente prova. Per nessun gruppo, inoltre, è stata evidenziata una perdita di punti di BCS superiore a -0.5/5 punti tra il parto ed il post-partum, in accordo con quanto descritto in letteratura per una transizione efficace (Caixeta and Omontese, 2021). Sulla base dei dati ottenuti possiamo quindi ipotizzare che il management alimentare della mandria nelle aziende reclutate per la prova fosse sufficientemente buono per supportare il BCS degli animali e conseguentemente la loro produzione di latte (Piazza et al., 2022). Nonostante questo dato, alcuni dei gruppi considerati nella prova hanno comunque manifestato condizioni di estesa lipomobilizzazione e chetosi subclinica. Ciò potrebbe essere indicativo della presenza di altri fattori in grado di influenzare l'insorgere di disordini metabolici.

Altri parametri metabolici la cui valutazione è utile, specialmente per la loro correlazione con lo stato di salute del fegato, sono gli enzimi epatici (AST, ALT, GGT) e la bilirubina totale (BIL.T.) (Puppel and Kuczyńska, 2016). Quando vi è un'infiltrazione lipidica nel fegato, nel parenchima dell'organo si verifica una lesione ed un conseguente innalzamento delle concentrazioni di questi enzimi (Stefani et al., 2011). Nel presente studio abbiamo scelto di indagare AST e bilirubina in quanto parametri più indicativi di danneggiamento epatico rispetto ad ALT, considerato più aspecifico, e GGT, maggiormente associato alle vie biliari che al parenchima dell'organo (González et al., 2011; Sakowski et al., 2012). Per quanto riguarda le concentrazioni di AST, il cutoff utilizzato nel presente studio per discriminare la possibile presenza di danno epatico era >100 UI/L (Cao et al., 2017). Osservando i risultati ottenuti nel presente studio si può sottolineare come questa soglia abbia permesso di distinguere due gruppi caratterizzati da un'elevata attività di AST in T1: GR2 (sospetto danneggiamento epatico) e GR4 (sospetta lipidosi epatica). Quest'ultimo gruppo di bovine presentava in media valori di AST più elevati del cutoff anche nel secondo post-partum (T2). Questi risultati confermano quindi quanto riportato in letteratura riguardo al danno epatico che si può

verificare quando la bovina non è in grado di affrontare adeguatamente il periodo di transizione, ed il conseguente rilascio di enzimi epatici in circolo (Sejersen et al., 2012). I risultati confermano inoltre quanto riportato riguardo la rilevazione di concentrazioni di AST più elevate in bovine che soffrono di lipidosi epatica, da lieve a grave, rispetto ad altre bovine, come è emerso anche da questa prova per il gruppo GR4. Questo fenomeno è probabilmente correlato alle condizioni patologiche che colpiscono gli epatociti in corso di lipidosi o a fenomeni necrotici dell'organo (Elshafey et al., 2023). Il gruppo GR2 (sospetto danneggiamento epatico), invece, presentava concentrazioni di AST significativamente più elevate a T1 rispetto a GR1 (bovine sane) e a GR3, nonostante non superassero il cutoff prestabilito e tornassero a non presentare differenze significative a T2. Questo è legato probabilmente alle ripercussioni negative che un danneggiamento epatico può avere sulla funzionalità dell'organo, e sull'innalzamento delle concentrazioni di AST anche in assenza di segni clinici (Giannuzzi et al., 2021).

Per quanto riguarda invece la concentrazione di BIL.T., il suo aumento nella prima parte della lattazione è solitamente da imputare al minore uptake di questo metabolita da parte del fegato in favore di un maggiore uptake di NEFA (Puppel and Kuczyńska, 2016). L'aumento delle concentrazioni plasmatiche di bilirubina può inoltre essere dovuto a patologie epatiche, quali epatite acuta o steatosi, o patologie epatobiliari, come la colestasi (Stefani et al., 2011). Nel presente studio i primi tre gruppi (GR1, GR2, GR3) non mostravano variazioni significative nelle concentrazioni misurate di BIL.T., mentre GR4 (sospetta lipidosi) presentava valori più elevati nel primo post-partum (T1) rispetto al parto (T0), indicativi probabilmente di danni a carico del parenchima epatico e/o delle vie biliari a causa dell'accumulo di lipidi nel fegato. Questo ha fatto sì che a T1 GR4 presentasse differenze significative rispetto agli altri gruppi. Sulla base di un esame biochimico si può definire una condizione di iperbilirubinemia quando le concentrazioni di bilirubina sono pari a 1-2 mg/dL, spesso riscontrabili in bovine con lipidosi epatica associata a chetosi (Puppel and Kuczyńska, 2016). Nel presente studio tutti i gruppi presentavano livelli di BIL.T. superiori a 2 mg/dL in tutti i tempi (T0, T1, T2), indicativi quindi di un certo grado di alterazione della funzionalità epatica presente anche in bovine clinicamente sane durante il periodo di transizione. La maggiore rilevazione di bilirubina sembra anche essere legata ad un'eccessiva risposta infiammatoria di fase acuta, che può provocare una maggiore difficoltà nell'eliminazione di bilirubina da parte del fegato ed un danno all'organo stesso (Bossart et al., 2012).

Nella pratica clinica, la valutazione degli indicatori epatici è uno strumento utile che può rappresentare un aiuto anche per stabilire la prognosi di lipidosi in corso di trattamento. Tuttavia, questo tipo di indagine andrebbe associata ad un esame ecografico del fegato per ottenere una maggiore quantità di informazioni (Elshafey et al., 2023).

5.2 Associazione tra indagine ecografica e stato di salute del fegato

L'indagine ecografica svolta in questo studio aveva il duplice obiettivo di: valutare la texture del parenchima epatico tramite software con lo scopo di stimarne oggettivamente il contenuto lipidico; misurare direttamente sull'immagine ecografica il PVD, la PVA, la DPV e la DL. Sia il contenuto lipidico stimato che le misurazioni ecografiche rappresentano indicatori utili per valutare lo stato di salute del fegato ed evidenziare eventuali condizioni patologiche, in primis lipidosi epatica (Giannuzzi et al., 2021). Tuttavia, il valore diagnostico delle misurazioni epatiche per la lipidosi può essere spesso limitato a causa dell'elevata variabilità individuale delle bovine (Haudum et al., 2011). Nel presente studio, in tutti i gruppi e in tutte le tempistiche di valutazione (T0, T1, T2) il quantitativo epatico di trigliceridi stimato (TAG) era compreso nel range 30-50 mg/g, che identifica una condizione di lipidosi epatica lieve (Bobe et al., 2004; Starke et al., 2010). Questo risultato da un lato ha confermato la selezione di bovine clinicamente sane effettuata all'inizio della prova, con l'esclusione di animali che avrebbero potuto presentare un livello più grave di patologia; dall'altro sottolinea l'importanza dell'ecografia come metodo di identificazione di bovine che, pur presentando un grado lieve di patologia, possono comunque causare perdite economiche all'azienda a causa di performances ridotte, complicanze successive o insorgenza di ulteriori fattori aggravanti (Gross, 2023). Si sospetta che un lieve o moderato aumento della concentrazione epatica di trigliceridi non sia necessariamente associato a ridotte performances dal punto di vista produttivo e riproduttivo; tuttavia, nessuno studio è riuscito finora a definire quale incremento specifico di TAG a livello epatico sia associato a disfunzioni nella lattazione, nello stato di salute dell'animale e nella riproduzione (Arshad and Santos, 2022). In generale, è noto che l'accumulo di lipidi negli epatociti causa un rigonfiamento del parenchima, con conseguente aumento delle dimensioni dell'organo, margini arrotondati, maggiore ecogenicità del tessuto epatico vicino alla parete addominale, e scarsa o nessuna visualizzazione dei vasi epatici (Mahdi Komeilian et al., 2011). Dal punto di vista sistemico, l'aumento dei TAG accresce la morbilità ed il rischio di patologie multiple nell'animale, ed è associato a stress ossidativo (Ceciliani et al., 2018). Il possibile meccanismo eziopatogenetico sottostante è relativo alla compromissione della funzionalità degli epatociti a causa dell'accumulo di lipidi al loro interno, con conseguente diminuzione del ruolo fondamentale del fegato come organo che permette un corretto adattamento al metabolismo. A maggiori concentrazioni di TAG si associano una maggiore perdita di peso vivo e BCS, e un aumento dei livelli ematici di BHB e NEFA (Arshad and Santos, 2022). Nella presente tesi i gruppi GR1 e GR2 non hanno mostrato variazioni significative di TAG nell'arco del tempo. Il gruppo GR4, invece, presentava valori medi superiori

rispetto agli altri gruppi a T2, a conferma di quanto riportato in letteratura riguardo la lipidosi epatica, che si verifica principalmente nelle 4 settimane che seguono il parto ed è caratterizzata da un contenuto più elevato di TAG rispetto al periodo precedente (Bobe et al., 2004). Questo stesso gruppo ha mostrato inoltre un avvicinamento del valore medio alla soglia di 50 mg/g, utilizzata per discriminare grado lieve e moderato di lipidosi, nel periodo post-partum. Il gruppo GR3, invece, presentava valori di TAG a T1 inferiori rispetto a T0, e successivamente superiori a T2, senza però manifestare differenze significative tra T0 e T2. Si può supporre che in questo gruppo di bovine la lipomobilizzazione non sia risultata in un grande accumulo epatico di TAG nel primo post-partum, a causa dell'utilizzo quasi completo dei NEFA circolanti o della corretta eliminazione di TAG dal fegato attraverso le VLDL.

I risultati di questa tesi relativamente al PVD, d'altro canto, hanno evidenziato un aumento di questo valore nel passaggio dal parto al primo post-partum in tutti i gruppi di bovine, ad eccezione di GR1 (sane), e sono in accordo con uno studio precedente (Fiore et al., 2018). Secondo Giannuzzi et al. (2021), le variazioni del PVD e dei metaboliti relativi alla funzionalità epatica, tra i quali AST e bilirubina totale, sono indicatori promettenti dei cambiamenti metabolici del fegato, e in quanto tali dovrebbero essere investigati ulteriormente per la diagnosi di lipidosi. In tutti i gruppi di questa prova il valore di PVD non si è distaccato eccessivamente dal limite inferiore del range fisiologico 2,9-5,3 cm indicato da Braun (2009). L'aumento dei valori evidenziato nel periodo post-partum potrebbe essere dovuto a variazioni para-fisiologiche del PVD durante il periodo di transizione, o essere un potenziale indicatore di disordini metabolici e/o lipidosi epatica, considerate le differenze significative tra il gruppo GR1 e tutti gli altri evidenziate a T1.

La misurazione della PVA, invece, è un'espressione del diametro della vena porta ed è direttamente collegata al flusso sanguigno portale (Piazza et al., 2022). Nella presente tesi il gruppo GR1 presentava a T1 valori inferiori rispetto agli altri gruppi, dai quali infatti differiva significativamente. Possiamo sospettare che anche la PVA, analogamente al PVD, sia una misurazione epatica che tende ad aumentare in corso di danneggiamento epatico, estesa lipomobilizzazione, o lipidosi epatica.

Se consideriamo la DPV GR3 presentava valori significativamente superiori nel post-partum rispetto a GR1, GR2 e GR4. Si può ipotizzare, quindi, che questa misurazione non possa essere correlata significativamente a stati patologici del fegato.

Per quanto riguarda la DL, i gruppi GR1 e GR2 non hanno evidenziato differenze significative nell'arco del tempo della prova. Il mantenimento dei valori medi del gruppo GR1 (bovine sane) in un range compreso tra 151,00 e 163,00 mm è in disaccordo con il cutoff di 152,6 mm segnalato da Fiore et al. (2018) per l'identificazione ecografica di lipidosi epatica. I gruppi GR3 e GR4, tuttavia, hanno mostrato un aumento del valore medio nel passaggio dal parto (T0) al primo post-partum

(T1), con valori ben più elevati di 15 cm. Si può sospettare, quindi, che alla lipidosi epatica e ad un'eccessiva lipomobilizzazione sia associata una maggiore profondità del fegato misurata in T1, come indicato da Mahdi Komeilian et al. (2011).

Considerando i quattro gruppi di bovine nel passaggio dal parto al primo post-partum (T1), il gruppo GR1 (sano) ha mostrato un aumento delle concentrazioni di NEFA, BHB e AST, oltre ad un aumento successivo del PVD in T2. Questi risultati sono indicativi di un certo grado di mobilizzazione delle riserve corporee che si verifica in maniera fisiologica durante il periodo di transizione in tutte le bovine, comprese quelle che non manifestano successivamente disordini metabolici. Il gruppo GR2 ha mostrato un andamento simile, con una maggiore attività di AST nel post-partum ed un innalzamento del valore della PVA. Per questo gruppo il sospetto di danneggiamento epatico è stato formulato sulla base delle concentrazioni di AST a T1 e dei valori medi di parametri tendenzialmente più elevati rispetto al gruppo GR1. Il gruppo GR3, invece, presentava un aumento di NEFA, BHB, AST, DPV e DL, con un ulteriore aumento del PVD in T2, ed una diminuzione di TAG. In questo gruppo le concentrazioni dei principali parametri metabolici, in particolare NEFA e BHB, risultavano essere più elevate rispetto ai primi due gruppi, in mancanza tuttavia di una elevata attività di AST: ciò ha permesso di ipotizzare che questo gruppo fosse andato incontro ad una lipomobilizzazione intensa durante il periodo di transizione. Il gruppo GR4, infine, è stato classificato come sospetta lipidosi epatica di grado lieve, in quanto presentava valori di NEFA, BHB, AST, BIL.T., TAG, PVD, DL e PVA maggiori rispetto agli altri gruppi nel post-partum. Per questo gruppo, inoltre, le concentrazioni di BHB hanno permesso una sua classificazione in chetosi subclinica sia in T1 che in T2.

6. Conclusioni

In conclusione della presente tesi, possiamo evidenziare come l'analisi biochimica dei principali parametri metabolici sia uno strumento adeguato per valutare l'adattamento della bovina da latte al NEB attraverso l'osservazione delle variazioni di tali parametri durante il periodo di transizione. I ruoli di NEFA, BHB ed AST come indicatori della mobilizzazione delle riserve corporee e dello stato di salute del fegato sono stati confermati dalle differenze ottenute tra i diversi gruppi nel primo post-partum.

Per quanto riguarda l'indagine epatica, le variazioni dei valori di PVD, PVA, DPV e DL sono risultate poco utili per la distinzione tra animali sani e animali con danneggiamento epatico o lipomobilizzazione.

Le differenze più marcate riscontrate nel gruppo GR4 per la componente metabolica ed ecografica hanno suggerito, tuttavia, il potenziale utilizzo combinato di queste due tecniche per la diagnosi precoce di lipidosi epatica, anche di grado lieve.

Ulteriori studi sono necessari per ampliare le attuali conoscenze relative all'ecografia epatica e per verificare l'attendibilità dell'utilizzo di questa tecnica abbinata ad esami biochimici. Ciò potrebbe essere utile per il monitoraggio della lipidosi in campo, la distinzione tra animali sani e malati e la prevenzione di successive ripercussioni negative per l'animale in sé e per il profitto dell'azienda.

7. Bibliografía

1. Abuelo A., Hernández J., Benedito J.L. and Castillo C. (2016). Association of oxidative status and insulin sensitivity in periparturient dairy cattle: an observational study. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100, 279–286
2. Abuelo A., Hernández J., Benedito J.L. and Castillo C. (2019). Redox Biology in Transition Periods of Dairy Cattle: Role in the Health of Periparturient and Neonatal Animals. *Antioxidants*, 8, 20
3. Andjelić B., Djoković R., Cincović M., Bogosavljević-Bošković S., Petrović M., Mladenović J. and Čukić A. (2022). Relationships between Milk and Blood Biochemical Parameters and Metabolic Status in Dairy Cows during Lactation. *Metabolites*, 12, 733
4. Angeli E., Trionfini V., Gareis N.C., Matiller V., Huber E., Rey F., Salvetti N.R., Ortega H.H. and Hein G.J. (2019a). Protein and gene expression of relevant enzymes and nuclear receptor of hepatic lipid metabolism in grazing dairy cattle during the transition period. *Research in Veterinary Science*, 123, 223–231
5. Angeli E., Rodríguez F.M., Rey F., Santiago G., Matiller V., Ortega H.H. and Hein G.J. (2019b). Liver fatty acid metabolism associations with reproductive performance of dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, 208, 106104
6. Arshad U. and Santon J.E.P. (2021). Hepatic triacylglycerol associations with production and health in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 105, 5393–5409
7. Aschenbach J.R., Kristensen N.B., Donkin S.S., Hammon H.M. and Penner G.B. (2010). Gluconeogenesis in Dairy Cows: The Secret of Making Sweet Milk from Sour Dough. *Life*, 62, 869–877
8. Banzato T., Fiore E., Morgante M., Manuali E. and Zotti A. (2016). Texture analysis of B-mode ultrasound images to stage hepatic lipidosis in the dairy cow: A methodological study. *Research in Veterinary Science*, 108, 71–75
9. Bell A.W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*, 73, 2804–2819
10. Bertoni G., Trevisi E., Han X. and Bionaz M. (2008). Effects of Inflammatory Conditions on Liver Activity in Puerperium Period and Consequences for Performance in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 91, 3300–3310

11. Bertoni G. and Trevisi E. (2013). Use of the Liver Activity Index and Other Metabolic Variables in the Assessment of Metabolic Health in Dairy Herds. *Veterinary Clinics of Food Animals*, 29, 413–431
12. Bionaz M., Trevisi E., Calamari L., Librandi F., Ferrari A. and Bertoni G. (2007). Plasma Paraoxonase, Health, Inflammatory Conditions, and Liver Function in Transition Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 90, 1740–1750
13. Blond L. and Buczinski S. (2009). Basis of Ultrasound Imaging and the Main Artifacts in Bovine Medicine. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 25, 553-565
14. Bobe G., Young J.W. and Beitz D.C. (2004). Invited Review: Pathology, Etiology, Prevention, and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 87, 3105–3124
15. Bobe G., Amin V.R., Hippen A.R., She P., Young J.W. and Beitz D.C. (2008) Non-invasive detection of fatty liver in dairy cows by digital analyses of hepatic ultrasonograms. *Journal of Dairy Research*, 75, 84-89
16. Bönhof J.A. (2016a). Ultrasound Artifacts – Part 1. *Ultraschall in Med*, 37, 140-156
17. Bönhof J.A. (2016b). Ultrasound Artifacts – Part 2. *Ultraschall in Med*, 38, 130-148
18. Bossaert P., Trevisi E., Opsomer G., Bertoni G., De Vliegher S. and Leroy J.L.M.R. (2012). The association between indicators of inflammation and liver variables during the transition period in high-yielding dairy cows: An observational study. *The Veterinary Journal*, 192, 222–225
19. Braun U. (2009). Ultrasonography of the Liver in Cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 25, 591-609
20. Cadorniga-Valino C., Grummer R.R., Armentano L.E., Donkin S.S. and Bertics S.J. (1997). Effects of Fatty Acids and Hormones on Fatty Acid Metabolism and Gluconeogenesis in Bovine Hepatocytes. *Journal of Dairy Science*, 80, 646–656
21. Cainzos J.M., Andreu-Vazquez C., Guadagnini M., Rijpert-Duvivier A. and Duffield T.F. (2022). A systematic review of the cost of ketosis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 105, 6175-6195
22. Caixeta L.S. and Omontese B.O. (2021). Monitoring and Improving the Metabolic Health of Dairy Cows during the Transition Period. *Animals*, 11, 352
23. Cao Y., Zhang J., Yang W., Xia C., Zhang H., Wang Y. and Xu C. (2017). Predictive value of plasma parameters in the risk of postpartum ketosis in dairy cows. *Journal of Veterinary Research*, 61, 91-95

24. Carlson D.B., McFadden J.W., D'Angelo A., Woodworth J.C. and Drackley J.K. (2007). Dietary L-Carnitine Affects Periparturient Nutrient Metabolism and Lactation in Multiparous Cows. *Journal of Dairy Science*, 90, 3422-3441
25. Cascone G., Licitra F., Stamilla A., Amore S., Dipasquale M., Salonia R., Antoci F. and Zecconi A. (2022). Subclinical Ketosis in Dairy Herds: Impact of Early Diagnosis and Treatment. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 895468
26. Castillo C., Hernández J., Bravo A., Lopez-Alonso M., Pereira V. and Benedito J.L. (2005). Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 169, 286–292
27. Cebra C.K., Garry F.B., Getzy D.M. and Fettman M.J. (1997). Hepatic Lipidosis in Anorectic, Lactating Holstein Cattle: A Retrospective Study of Serum Biochemical Abnormalities. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11, 231-237
28. Ceciliani F., Lecchi C., Urh C. and Sauerwein H. (2018). Proteomics and metabolomics characterizing the pathophysiology of adaptive reactions to the metabolic challenges during the transition from late pregnancy to early lactation in dairy cows. *Journal of Proteomics*, 178, 92–106
29. Constable P.D., Hinchcliff K.W., Done S.H. and Grünberg W. (2017). *Veterinary Medicine. A textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. Elsevier*, 11th Edition. Cap. 17, pp. 1662-1757
30. Contreras G.A., O'Boyle N.J., Herdt T.H. and Sordillo L.M. (2010). Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 93, 2508-2516
31. Contreras G.A. and Sordillo L.M. (2011). Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34, 281-289
32. Cozzi G., Ravarotto L., Gottardo F., Stefani A.L., Contiero B., Moro L., Brscic M. and Dalvit P. (2011). Short communication: Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. *Journal of Dairy Science*, 94, 3895–3901
33. Dechow C.D., Rogers G.W., Sander-Nielsen U., Klei L., Lawlor T.J., Clay J.S., Freeman A.E., Abdel-Azim G., Kuck A. and Schnell S. (2004). Correlations Among Body Condition Scores from Various Sources, Dairy Form, and Cow Health from the United States and Denmark. *Journal of Dairy Science*, 87, 3526–3533

34. Drackley J.K. (1999). Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? *Journal of Dairy Science*, 82, 2259–2273
35. Drong C., Meyer U., von Soosten D., Frahm J., Rehage J., Breves G. and Dänicke S. (2016). Effect of monensin and essential oils on performance and energy metabolism of transition dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100, 537-551
36. Du X., Chen L., Huang D., Peng Z., Zhao C., Zhang Y., Zhu Y., Wang Z., Li X. and Liu G. (2017). Elevated Apoptosis in the Liver of Dairy Cows with Ketosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43, 568-578
37. Du X., Shen T., Wang H., Qin X., Xing D., Ye Q., Shi Z., Fang Z., Zhu Y., Yang Y., Peng Z., Zhao C., Lv B., Li X., Liu G. and Li X. (2018). Adaptations of hepatic lipid metabolism and mitochondria in dairy cows with mild fatty liver. *Journal of Dairy Science*, 101, 9544–9558
38. D’Occhio M.J., Baruselli P.S. and Campanile G. (2019). Metabolic health, the metabolome and reproduction in female cattle: a review. *Italian Journal of Animal Science*, 18, 858-867
39. Edmonson A.J., Lean I.J., Weaver L.D., Farver T. and Webster G. (1989). A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 72, 68-78
40. Elshafey B.G., Elfadadny A., Metwally S., Saleh A.G., Ragab R.F., Hamada R., Mandour A.S., Hendawy A.O., Alkazmi L., Ogaly H.A. and Batiha G.E. (2023). Association between biochemical parameters and ultrasonographic measurement for the assessment of hepatic lipidosis in dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, 22, 136-147
41. Esposito G., Irons P.C., Webb E.C. and Chapwanya A. (2014). Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 144, 60–71
42. Farney J.K., Mamedova L.K., Coetzee J.F., Kukanich B., Sordillo L.M., Stoakes S.K., Minton J.E., Hollis L.C. and Bradford B.J. (2013). Anti-inflammatory salicylate treatment alters the metabolic adaptations to lactation in dairy cattle. *American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 305, R110–R117
43. Ferguson J.D., Galligan D.T. and Thomsen N. (1994). Principal Descriptors of Body Condition Score in Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 77, 2695-2703
44. Fiore E., Giancesella M., Arfuso F., Giudice E., Piccione G., Lora M., Stefani A. and Morgante M. (2014). Glucose infusion response on some metabolic parameters in dairy cows during transition period. *Archiv Tierzucht*, 57, 1-9

45. Fiore E., Piccione G., Perillo L., Barberio A., Manuali E., Morgante M. and Giancesella M. (2015). Hepatic lipidosis in high-yielding dairy cows during the transition period: haematochemical and histopathological findings. *Animal Production Science*
46. Fiore E., Perillo L., Morgante M., Giudice E., Contiero B., Curone G., Manuali E., Pavone S., Piccione G. and Giancesella M. (2018). Ultrasonographic measurement of liver, portal vein, hepatic vein and perivisceral adipose tissue in high-yielding dairy cows with fatty liver during the transition period. *Journal of Dairy Research*, Page 1 of 8
47. Giannuzzi D., Tessari R., Pegolo S., Fiore E., Giancesella M., Trevisi E., Marsan P.A., Premi M., Piccioli-Cappelli F., Tagliapietra F., Gallo L., Schiavon S., Bittante G. and Cecchinato A. (2021). Associations between ultrasound measurements and hematochemical parameters for the assessment of liver metabolic status in Holstein–Friesian cows. *Nature portfolio Scientific Reports*, 11, 16314
48. Goff J. and Horst R. (1997). Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders. *Journal of Dairy Science*, 80, 1260-1268
49. González F., Muiño R., Pereira V., Campos R. and Benedito J.L. (2011). Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. *Journal of Veterinary Science*, 12, 251-255
50. Gordon J.L., LeBlanc S.J. and Duffield T.F. (2013). Ketosis Treatment in Lactating Dairy Cattle. *Veterinary Clinics in Food Animals*, 29, 433–445
51. Graber M., Kohler S., Kaufmann T., Doherr M.G., Bruckmaier R.M. and van Dorland H.A. (2010). A field study on characteristics and diversity of gene expression in the liver of dairy cows during the transition period. *Journal of Dairy Science*, 93, 5200–5215
52. Gross J. (2023). Hepatic Lipidosis in Ruminants. *Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice*, 39, 371-383
53. Grummer R.R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*, 73, 2820-2833
54. Grummer R.R. (2008). Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, 176, 10–20
55. Haudum A., Starke A., Beyerbach M., Wohlsein P. and Rehage J. (2011). Ultrasonographic assessment of liver dimensions in dairy cows with different hepatic triacylglycerol content. *Journal of Animal Science*, 89, 1392-400
56. Hayirli A., Grummer R.R., Nordheim E.V. and Crump P.M. (2002). Animal and Dietary Factors Affecting Feed Intake During the Prefresh Transition Period in Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 85, 3430–3443

57. Herdt T.H. (2000). Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the Etiology of Ketosis and Fatty Liver. *Veterinary Clinics of North America*, 16
58. Horst E.A., Kvidera S.K. and Baumgard L.H. (2021). Invited review: The influence of immune activation on transition cow health and performance – A critical evaluation of traditional dogmas. *Journal of Dairy Science*, 104, 8
59. Imhasly S., Naegeli H., Baumann S., von Bergen M., Luch A., Jungnickel H., Potratz S. and Gerspach C. (2014). Metabolomic biomarkers correlating with hepatic lipidosis in dairy cows. *BMC Veterinary Research*, 10, 122
60. Ingvarstsen K.L., Dewhurst R.J. and Friggens N.C. (2003). On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science*, 83, 277–308
61. Jorritsma R., Thanasak J., Houweling M., Noordhuizen J.P.T.M. and Müller K.E. (2004). Effects of a single dose of dexamethasone-21-isonicotinate on the metabolism of heifers in early lactation. *Veterinary Record*, 155, 521–523
62. Kalaitzakis E., Roubies N., Panousis N., Pourliotis K., Kaldrymidou E. and Karatzias H. (2007). Clinicopathologic evaluation of hepatic lipidosis in periparturient dairy cattle. *American College of Veterinary Internal Medicine*, 21, 835–845
63. Kenéz A., Dänicke S., Rolle-Kampczyk U., von Bergen M. and Huber K. (2016). A metabolomics approach to characterize phenotypes of metabolic transition from late pregnancy to early lactation in dairy cows. *Metabolomics*, 12, 165
64. Kessel S., Stroehl M., Meyer H.H.D., Hiss S., Sauerwein H., Schwarz F.J. and Bruckmaier R.M. (2008). Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions. *Journal of Animal Science*, 86, 2903–2912
65. Kessler E.C., Gross J., Bruckmaier R.M. and Albrecht C. (2014). Cholesterol metabolism, transport, and hepatic regulation in dairy cows during transition and early lactation. *Journal of Dairy Science*, 97, 5481–5490
66. Kupczyński R., Szumny A., Wujcikowska K. and Pachura N. (2020). Metabolism, Ketosis Treatment and Milk Production after Using Glycerol in Dairy Cows: A Review. *Animals*, 10, 1379
67. Lacasse P., Vanacker N., Ollier S. and Ster C. (2018). Innovative dairy cow management to improve resistance to metabolic and infectious diseases during the transition period. *Research in Veterinary Science*, 116, 40–46

68. Laubenthal L., Ruda L., Sultana N., Winkler J., Rehage J., Meyer U., Dänicke S., Sauerwein H. and Häussler S. (2017). Effect of increasing body condition on oxidative stress and mitochondrial biogenesis in subcutaneous adipose tissue depot of nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100, 4976–4986
69. LeBlanc S.J., Lissemore K.D., Kelton D.F., Duffield T.F. and Leslie K.E. (2006). Major Advances in Disease Prevention in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 89, 1267–1279
70. LeBlanc S.J. (2010). Monitoring Metabolic Health of Dairy Cattle in the Transition Period. *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 56, S29–S35
71. Lisciandro G.R. (2013). Focused Ultrasound Techniques for the Small Animal Practitioner. *Wiley-Blackwell*. Cap. 1, pp. 1-16
72. Locher L., Häussler S., Laubenthal L., Singh S.P., Winkler J., Kinoshita A., Kenéz A., Rehage J., Huber K., Sauerwein H. and Dänicke S. (2015). Effect of increasing body condition on key regulators of fat metabolism in subcutaneous adipose tissue depot and circulation of nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98, 1057–1068
73. Loiklung C., Sukon P. and Thamrongyoswittayakul C. (2022). Global prevalence of subclinical ketosis in dairy cows: A systematic review and meta-analysis. *Research in Veterinary Science*, 144, 66-76
74. Lucy M.C., Butler S.T. and Garverick H.A. (2014). Endocrine and metabolic mechanisms linking postpartum glucose with early embryonic and foetal development in dairy cows. *Animal*, 8, 82–90
75. Mahdi Komeilian M., Sakha M., Gholi Nadalian M. and Veshkini A. (2011). Hepatic Ultrasonography of Dairy Cattle in Postpartum Period: Finding the Sonographic Features of Fatty Liver Syndrome. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5, 701-706
76. Malhi H. and Gores G.J. (2008). Molecular Mechanisms of Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Seminars in Liver Disease*, 28, 360–369
77. Mammi L.M.E., Guadagnini M., Mechor G., Cainzos J.M., Fusaro I., Palmonari A. and Formigoni A. (2021). The Use of Monensin for Ketosis Prevention in Dairy Cows during the Transition Period: A Systematic Review. *Animals*, 11, 1988
78. Mann S., Nydam D.V., Abuelo A., Leal Yepes F.A., Overton T.R. and Wakshlag J.J. (2016). Insulin signaling, inflammation, and lipolysis in subcutaneous adipose tissue of transition dairy cows either overfed energy during the prepartum period or fed a controlled-energy diet. *Journal of Dairy Science*, 99, 6737–6752
79. Mayasari N., Chen J., Ferrari A., Bruckmaier R.M., Kemp B., Parmentier H.K., van Knegsel A.T.M. and Trevisi E. (2017). Effects of dry period length and dietary energy source on

- inflammatory biomarkers and oxidative stress in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100, 4961–4975
80. McArt J.A., Nydam D.V., Ospina P.A. and Oetzel G.R. (2011). A field trial on the effect of propylene glycol on milk yield and resolution of ketosis in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science*, 94, 6011–6020
 81. McArt J.A., Nydam D.V. and Oetzel G.R. (2012). Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 95, 5056–5066
 82. McFadden J.W. (2020). Review: Lipid biology in the periparturient dairy cow: contemporary perspectives. *Animal*, 14, s165–s175
 83. Meola, M. (2008). Principi fisici dell'ecografia. Natura e caratteristiche fisiche degli ultrasuoni. *Eureka*, 1a edizione, Lucca. Capitolo 1, pp. 1-52
 84. Mulligan F.J. and Doherty M.L. (2008). Production diseases of the transition cow. *The Veterinary Journal*, 176, 3–9
 85. Oetzel G.R. (2004). Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics of Food Animals*, 20, 651-674
 86. Ospina P.A., Nydam D.V., Stokol T. and Overton T.R. (2010). Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science*, 93, 546–554
 87. Peek S.F. and Divers T.J. (2018). *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*. Elsevier, 3rd edition. Cap. 15, pp. 713-736
 88. Piazza M., Giannuzzi D., Tessari R., Fiore E., Giancesella M., Pegolo S., Schiavon S., Trevisi E., Piccioli-Cappelli F., Cecchinato A. and Gallo L. (2022). Associations between ultrasound hepatic measurements, body measures, and milk production traits in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 105, 7111–7124
 89. 1E. Trevisi,3 F. Piccioli-Cappelli,3 A. Cecchinato,1 and L. Gallo1
 90. Pires J.A.A., Souza A.H. and Grummer R.R. (2007). Induction of Hyperlipidemia by Intravenous Infusion of Tallow Emulsion Causes Insulin Resistance in Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 90, 2735–2744
 91. Prabhu S.J., Kanal K., Bhargava P., Vaidya S. and Dighe M.K. (2014). Ultrasound Artifacts. Classification, Applied Physics With Illustrations, and Imaging Appearances. *Ultrasound Quarterly*, 30, 145-157
 92. Puppel K. and Kuczyńska B. (2016). Metabolic profiles of cow's blood; a review. *Journal of Science Food Agriculture*, 96, 4321–4328

93. R Core Team (2018): A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>
94. Reynolds C.K., Aikman P.C., Lupoli B., Humphries D.J. and Beever D.E. (2003). Splanchnic Metabolism of Dairy Cows During the Transition From Late Gestation Through Early Lactation. *Journal of Dairy Science*, 86, 1201–1217
95. Roche J.R., Dillon P.G., Stockdale C.R., Baumgard L.H. and VanBaale M.J. (2004). Relationships Among International Body Condition Scoring Systems. *Journal of Dairy Science*, 87, 3076–3079
96. Roche J.R., Friggens N.C., Kay J.K., Fisher M.W., Stafford K.J. and Berry D.P. (2009). Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*, 92, 5769–5801
97. Rousing T., Holm J.R., Krogh M.A., Østergaard S. and GplusE Consortium (2020). Expert-based development of a generic HACCP-based risk management system to prevent critical negative energy balance in dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 175, 104849
98. Rupprechter G., de Lourdes Adrien M., Larriestra A., Meotti O., Batista C., Meikle A. and Noro M. (2018). Metabolic predictors of peri-partum diseases and their association with parity in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 118, 191–198
99. Sakowski T., Kuczyńska B., Puppel K., Metera E., Słoniewski K. and Barszczewski J. (2012). Relationships between physiological indicators in blood, and their yield, as well as chemical composition of milk obtained from organic dairy cows. *Journal of Science, Food and Agriculture*, 92, 2905-2912
100. Seifi H.A., LeBlanc S.J., Leslie K.E. and Duffield T.F. (2011). Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, 188, 216–220
101. Sejersen H., Sørensen M.T., Larsen T., Bendixen E. and Ingvarsten K.L. (2012). Liver protein expression in dairy cows with high liver triglycerides in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 95, 2409–2421
102. Sordillo L.M., Contreras G.A., Aitken S.L. (2009). Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Animal Health Research Review*, 10, 53-63
103. Sordillo L.M. and Raphael W. (2013). Significance of Metabolic Stress, Lipid Mobilization, and Inflammation on Transition Cow Disorders. *Veterinary Clinics of Food Animals*, 29, 267–278
104. Spattini G. (2008). Gli artefatti in ecografia veterinaria: come riconoscerli e correggerli. *Veterinaria*, 22, 9-20

105. Starke A., Haudum A., Weijers G., Herzog K., Wohlsein P., Beyerbach M., de Korte C.L., Thijssen J.M. and Rehage J. (2010). Noninvasive detection of hepatic lipidosis in dairy cows with calibrated ultrasonographic image analysis. *Journal of Dairy Science*, 93, 2952–2965
106. Stefani A., Casu A. and Moro L. (2011). Semplice, semplice. Guida pratica all'interpretazione dei parametri di chimica-clinica nella bovina da latte. A cura di: SC5 Laboratorio di patologia clinica ed ematologia, IZSVE, 1a edizione
107. Stojević Z., Piršljin J., Milinković-Tur S., Zdelar-Tuk M. and Ljubić B.B. (2005). Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period. *Veterinarski arhiv*, 75, 67-73
108. Streeter R.N. and Step D.L. (2007). Diagnostic Ultrasonography in Ruminants. *Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice*, 23, 541-574
109. Sun F., Cao Y., Cai C., Li S., Yu C. and Yao J. (2016). Regulation of Nutritional Metabolism in Transition Dairy Cows: Energy Homeostasis and Health in Response to Post-Ruminal Choline and Methionine. *PLoS ONE*, 11, e0160659
110. Tatone E.H., Duffield T.F., LeBlanc S.J., DeVries T.J. and Gordon J.L. (2017). Investigating the within-herd prevalence and risk factors for ketosis in dairy cattle in Ontario as diagnosed by the test-day concentration of β -hydroxybutyrate in milk. *Journal of Dairy Science*, 100, 1308-1318
111. Tharwat M., Oikawa S. and Buczinski S. (2012). Ultrasonographic Prediction of Hepatic Fat Content in Dairy Cows during the Transition Period. *Veterinary Science and Technology*, 3
112. Trevisi E., Amadori M., Cogrossi S., Razzuoli E. and Bertoni G. (2012). Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 93, 695–704
113. Trevisi E. and Minuti A. (2018). Assessment of the innate immune response in the periparturient cow. *Research in Veterinary Science*, 116, 47–54
114. van Dorland H.A. and Bruckmaier R.M. (2013). Understanding diversity of hepatic metabolism and related adaptations in the early lactating dairy cow. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 8, 443-451
115. Wagner S.A. and Schimek D.E. (2010). Evaluation of the effect of bolus administration of 50% dextrose solution on measures of electrolyte and energy balance in postpartum dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*, 71, 1074–80

116. Wankhade P.R., Manimaran A., Kumaresan A., Jeyakumar S., Ramesha K.P., Sejian V., Rajendran D. and Varghese M.R. (2017). Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: A review. *Veterinary World*, vol. 10, EISSN 2231-0916
117. Wathes D.C., Fenwick M., Cheng Z., Bourne N., Llewellyn S., Morris D.G., Kenny D., Murphy J. and Fitzpatrick R. (2007). Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology*, 68, S232–S241
118. Weber C., Hametner C., Tuchscherer A., Losand B., Kanitz E., Otten W., Sauerwein H., Bruckmaier R.M., Becker F., Kanitz W. and Hammon H.M. (2013). Hepatic gene expression involved in glucose and lipid metabolism in transition cows: Effects of fat mobilization during early lactation in relation to milk performance and metabolic changes. *American Dairy Science Association*, 96, 5670–5681
119. White H.M. (2015). The Role of TCA Cycle Anaplerosis in Ketosis and Fatty Liver in Periparturient Dairy Cows. *Animals*, 5, 793-802
120. Ye J. (2013). Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med*, 7, 14–24
121. Zebeli Q., Ghareeb K., Humer E., Metzler-Zebeli B.U. and Besenfelder U. (2015). Nutrition, rumen health and inflammation in the transition period and their role on overall health and fertility in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 103, 126–136

Ringraziamenti

Ringrazio in primis il Prof. Matteo Giancesella per la passione che ha sempre dimostrato e trasmesso nei suoi insegnamenti in questo corso di laurea, e per la disponibilità che ha avuto nei miei confronti durante la stesura della tesi.

Un sentito ringraziamento va alla Dott.ssa Anastasia Lisuzzo per l'aiuto, la collaborazione e la pazienza con la quale mi ha seguito durante l'intero progetto.

Ringrazio anche il Prof. Enrico Fiore per i consigli utili che mi ha fornito riguardo la scrittura della tesi e l'attività pratica in campo.

Desidero ringraziare infine il Dott. Giacomo Catarin per il sostegno fisico e morale durante le uscite per il campionamento, oltre che per la passione che ha manifestato costantemente per la buiatria e che mi ha coinvolto fin dal primo giorno.