



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

**FACOLTA' DI AGRARIA
CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE
ANIMALI**

TESI DI LAUREA

Variazione delle popolazioni linfocitarie in bovine da latte durante il periodo di transizione in due allevamenti con diverse caratteristiche manageriali.

RELATORE: Prof. Gianfranco Gabai

CORRELATORE: Dott.ssa Letizia Moro

CORRELATORE: Dott.ssa AnnaLisa Stefani

LAUREANDO: Anna Maria Pengo

MATRICOLA N. 559322/STN

ANNO ACCADEMICO: 2008/2009

SOMMARIO

SOMMARIO	3
1. RIASSUNTO	5
Abstract	6
2. INTRODUZIONE	7
2.1. Periodo di transizione	7
2.1.1. Generalità	7
2.1.2. Lo stato metabolico della bovina in transizione	8
2.1.3. Ingestione, fabbisogni energetici e strategie alimentari nel post partum	13
2.1.4. Cambiamenti ormonali nel periodo di transizione	15
2.1.5. Le patologie del periparto	17
2.2. Il sistema immunitario	21
2.2.1. Generalità	21
2.2.2. Le cellule del sistema immunitario: linfociti, monociti neutrofilo e fagociti	23
2.3. Il sistema immunitario nel periodo di transizione	29
2.3.1. Il sistema immunitario e l'asse neuroendocrino	30
2.3.2. Il sistema immunitario e l'alimentazione	30
2.3.3. Il sistema immunitario e l'infiammazione	31
3. OBIETTIVO DELLA RICERCA	33
4. MATERIALI E METODI	34
4.1. Descrizione aziendale e scelta del campione	34
4.2. Disegno sperimentale	36
4.2.1. Esecuzione dei prelievi	36
4.2.2. Analisi di laboratorio	37

4.3. Analisi dei dati	41
5. RISULTATI E DISCUSSIONE	43
5.1. Descrizione dei parametri leucocitari	43
5.2. Descrizione delle sottopopolazioni linfocitarie: CD4 ⁺ , CD8 ⁺ CD4/CD8 WC1	44
5.3. Confronto dei parametri ematici tra primipare e pluripare	47
5.4. Confronto dei parametri ematici sulla produzione	49
5.5. Confronto aziendale dei parametri ematici	51
6. CONCLUSIONI	55
ALLEGATO 1	57
ALLEGATO 2	60
BIBLIOGRAFIA	68
7. RINGRAZIAMENTI	80

1. RIASSUNTO

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di indagare come i parametri ematici in particolare le sottopopolazioni linfocitarie $CD4^+$, $CD8^+$, WC1 e il rapporto $CD4/CD8$ varia durante il periodo di transizione, e se questi parametri possono essere possibili indici di immunosoppressione. Due aziende di bovine da latte con diverse caratteristiche manageriali sono state sottoposte a sperimentazione per 3 mesi (da ottobre 2008 a dicembre 2008). Le bovine sottoposte a sperimentazione sono state 13, rispettivamente 6 provenienti dall'azienda A e 7 dall'azienda B. Dalle bovine sono stati raccolti campioni di sangue a 15/10 e 5/1 giorni prima del parto e a 1/5, 10/15 e 30/35 giorni dopo il parto.

I campioni contenenti Li-eparina e K3EDTA sono stati sottoposti rispettivamente ad analisi citofluorimetrica e a esame emocromocitometrico. Con il siero ottenuto per centrifugazione si è effettuata invece l'elettroforesi delle sieroproteine.

L'analisi con citofluorimetro a flusso ha permesso di individuare la percentuale delle sottopopolazioni linfocitarie presenti nei singoli campioni e di determinare quindi l'andamento di quest'ultime durante il periodo oggetto di studio. L'esame emocromocitometrico invece ha consentito di analizzare i diversi leucociti.

Sebbene i dati non sono risultati statisticamente significativi si è osservato in prossimità del parto una diminuzione della percentuale di $CD4^+$ dei $CD8^+$, dei WC1, e del rapporto tra $CD4/CD8$.

Confrontando le pluripare con le primipare di entrambe le aziende si è riscontrata una diminuzione significativa dei linfociti e dei WC1 nelle pluripare rispetto alle primipare. Si è visto che anche la produzione incide significativamente sul numero di linfociti nonché sulle percentuali di $CD4^+$ e $CD8^+$, nelle bovine più produttive (produzione > di 40Kg/d) si sono riscontrati numeri più bassi di linfociti e una percentuale più elevata di $CD4^+$ e $CD8^+$.

Il confronto aziendale ha permesso di evidenziare come WBC, neutrofili, monociti, neutrofili/linfociti e $CD8^+$ variano significativamente tra le due aziende. L'azienda B, considerata peggiore dal punto di vista igienico-sanitario ha mostrato valori di WBC, neutrofili, e $CD8^+$ più bassi rispetto all'azienda A.

Abstract

The aim of this research is the investigation of the way blood profiles, especially the subset lymphocytaires CD4 cells, CD8 cells, WC1 and the CD4/CD8 ratio vary during the transition period and whether those profiles can be considered as possible indicators of immunosuppression.

Two different farms of dairy cows with distinct managerial features were submitted to testings for 3 months (from October 2008 to March 2008). Thirteen cows were taken as the object of the experimentation, six of them coming from the farm A and seven from the farm B.

Cow blood samples were gathered 15/10 and 5/1 days before the parturition and 1/5, 10/15 and 30/35 days after the parturition.

The samples containing Li-Heparin and K3EDTA have been presented respectively to the flow cytometric analysis and to the electromocytometric tests. With the blood serum obtained through the centrifugal action it has been possible to perform the electrophoresis.

The flow cytometric analysis enabled the identification of the percentage of subset lymphocytaires contained in the single samples and to set their flow during the time of research.

The electromocytometric tests allowed the analysis of the different types of leukocytes.

Even though the results did not turn out to be statistically remarkable, it was possible to note a reduction of the percentage of CD4 cells, CD8 cells, WC1 and CD4/CD8 ratio in the coming parturition time.

By comparing the pluriparous with the primiparous of both farms, it was possible to point out a meaningful decrease of lymphocytes and of WC1 in the former rather than in the latter. It was also observed that the milk yield bears remarkably on the number of lymphocytes as well as on the percentage of CD4 cells and CD8 cells. In the most fruitful dairy cows (milk yield > 40 Kg/d), it was noted a lower quantity of lymphocytes and a higher percentage of CD4 cells and CD8 cells.

The comparison of the two farms enabled to highlight how WBC, neutrophils, monocytes, neutrophils/lymphocytes and CD8 cells vary meaningfully from one farm to another.

The farm B, considered worst from a hygienic point of view, showed lower values of WBC, neutrophil and CD8 cells than the farm A.

2. INTRODUZIONE

Nel corso degli ultimi decenni, l'allevamento della vacca da latte si è sempre più intensificato, benché i consumi siano rimasti pressoché stabili, come pure la produttività; il numero delle bovine da latte nel nostro paese è pressoché diminuito. Questo è stato possibile perché l'intensa selezione genetica ha portato questi animali a produrre maggiori quantità di latte a discapito del loro stato fisiologico.

All'aumento della produttività infatti non è conseguito un aumento dell'ingestione per soddisfare i fabbisogni legati all'incremento produttivo, e questo inevitabilmente ha portato l'animale a squilibri metabolici e conseguenti patologie ad essi correlate. Quanto sopra citato rischia di mettere gravemente a repentaglio le 'performance' produttive e riproduttive degli animali stessi, con ripercussioni sull'economia aziendale. Il momento più critico del ciclo produttivo della lattifera è rappresentato dal periodo di transizione. Nasce da questa considerazione l'esigenza di un diverso e più mirato approccio nei confronti di questa fase tanto delicata quanto importante.

2.1 PERIODO DI TRANSIZIONE

2.1.1 Generalità

Il periodo di transizione, in passato chiamato "periparto" (Bertoni, 1979), viene definito come il periodo compreso tra le 3 settimane prima del parto e le 3 settimane dopo il parto (Grummer, 1995). Sebbene alcuni autori definiscano questo periodo in maniera leggermente differente, la definizione è stata ampiamente accettata (Drackley, 1999).

Il periodo di transizione, fra l'asciutta e la lattazione, è stato largamente studiato da numerosi autori (Grummer, 1995; Drackley, 1999; Ingvarlsen *et al.*, 2003) poiché racchiude in sé molteplici aspetti rilevanti tra cui quelli produttivi, fisiologico-endocrini, nutrizionali, manageriali e sanitari. Il che è fondamentale se si pensa alla problematica gestionale di tale periodo .

Da un punto di vista strettamente fisiologico, durante questo periodo, la bovina si trova ad affrontare l'ultima fase della gravidanza, il parto e l'inizio della lattazione. Tutti questi stati

creano cambiamenti metabolici endocrini e nutrizionali che vanno ad influire negativamente sulla produttività e sullo stato sanitario e riproduttivo della bovina nella successiva lattazione. Nella fase di transizione la bovina incontra una serie di problemi fra loro collegati e di notevole importanza:

- ❑ l'equilibrio endocrino e metabolico si modifica profondamente e rapidamente per prepararsi al parto ed alla lattazione (Chiesa *et al.*, 1991);
- ❑ i fabbisogni nutrizionali aumentano repentinamente sia per le necessità del feto sia, ed in misura molto più marcata, per la produzione di colostro e di latte;
- ❑ l'ingestione di alimenti si riduce fino al 30% ed oltre;
- ❑ l'attività epatica è spesso inadeguata rispetto alle necessità;
- ❑ il metabolismo minerale è fortemente sollecitato con forti rischi per l'omeostasi del calcio *in primis* ma anche del magnesio, del potassio e dei microelementi;
- ❑ la capacità di assorbimento di nutrienti da parte della mucosa ruminale e, forse dell'intestino, non è ancora ottimale;
- ❑ la competenza immunitaria è, spesso, alterata se non compromessa.

Goff e Horst (1997) a tal proposito considerano il periodo di transizione non solo come una fase critica per la vacca da latte ma piuttosto un' "esperienza disastrosa".

2.1.2 Lo stato metabolico della bovina in transizione

Le concentrazioni ematiche degli ormoni che regolano il metabolismo prima del parto vertono ad uno stato anabolico (Chiesa *et al.*, 1991), ossia vengono favoriti tutti quei processi di biosintesi delle molecole organiche più complesse a partire da quelle più semplici o dalle sostanze nutritive.

Questo è dovuto principalmente all'aumento dei fabbisogni di mantenimento e di gestazione che si verificano nell'imminente pre parto. La richiesta di energia, da parte del feto, per il suo sviluppo infatti è di trascurabile entità nei primi sei mesi di gravidanza ma aumenta progressivamente all'avvicinarsi del parto. Il consumo metabolico del feto infatti, misurato come peso specifico del consumo di ossigeno, nell'ultimo periodo della gravidanza, è circa il

doppio di quello della madre (Reynolds *et al.*, 1986). La maggior parte del carbonio e dell'azoto necessari per la crescita fetale e per il suo metabolismo sono forniti dal glucosio e dagli aminoacidi reperiti a livello placentare dalle riserve materne (Bell, 1995). (Il glucosio e il lattato rappresentano non più del 50-60% dei fabbisogni fetali, la deposizione di proteine costituisce al massimo il 50% e la deposizione di grasso meno del 5% dell'energia).

Anche l'aumento della richiesta energetica da parte dell'utero e della mammella, determinano l'incremento dei fabbisogni. Il consumo di glucosio, da parte delle componenti non fetali, dell'utero gravidico, in particolare della placenta, viene stimato al 65% del consumo netto totale (Reynolds *et al.*, 1986). Parte del glucosio utilizzato dall'utero viene completamente ossidato, mentre una considerevole frazione (30-40%) viene convertita in lattato e rilasciata nella circolazione materno fetale (Meschia *et al.*, 1980; Reynolds *et al.*, 1986). Sono stati inoltre segnalati da Reynolds e coll., (1986) e Ferrell, (1991) elevati consumi di aminoacidi da parte della placenta anche se tale evento rimane ancora inspiegato. L'aumento dei fabbisogni alimentari giornalieri durante l'ultimo periodo di gestazione sono evidenti e passano in breve tempo da 0.59 UFL/Kg ss nel 7° mese a 0.76 UFL/kg ss nel 9° mese (Spain e Scheer, 2002).

Come precedentemente affermato, l'energia e l'azoto necessari al feto per soddisfare i suoi fabbisogni di accrescimento vengono soddisfatti dal glucosio e dagli aminoacidi reperiti dal sangue materno tramite la circolazione materno fetale. L'assorbimento di glucosio, avviene per diffusione facilitata, (Stacey *et al.*, 1978) la quale varia a seconda del gradiente di concentrazione del glucosio nel sangue materno, influenzando quindi la glicemia materna. Di conseguenza, uno stato di ipoglicemia della bovina, durante l'ultimo periodo della gravidanza, influenzerà negativamente, diminuendone l'assorbimento di glucosio da parte dell'utero e del feto (Hay *et al.*, 1984; Leury *et al.*, 1990).

L'assorbimento degli aminoacidi da parte del feto, avviene invece per trasporto attivo (v. Bell, 1993). Di conseguenza la concentrazione di aminoacidi introdotti con la dieta e quindi presenti nel sangue materno, non influenza l'assorbimento di quest'ultimi da parte del feto (Lemons e Schreiner, 1983). Tuttavia l'assorbimento degli aminoacidi, indispensabile per la sintesi proteica dei tessuti fetali, è influenzato dalla presenza di energia, dato che l'assorbimento attivo prevede dispendio energetico. Un eventuale deficit energetico causa quindi una diminuzione della crescita fetale, poiché manca l'energia necessaria alla deposizione dei tessuti fetali, determinando quindi un aumento della secrezione di urea dovuta al catabolismo proteico (Lemons e Schreiner, 1983). Quindi, se il glucosio e gli aminoacidi rappresentano gli elementi essenziali e limitanti per lo sviluppo fetale, la disponibilità di

proteine e energia fornite dalla madre sembra essere di fondamentale importanza per la sintesi proteica dei tessuti fetali.

La madre, per soddisfare i fabbisogni amminoacidici ed energetici, attua una serie di strategie metaboliche volte a fornire proteine ed energia al feto. Queste strategie includono cambiamenti del metabolismo energetico (carboidrati) proteico e anche lipidico (Bell, 1995).

Si assiste quindi, nell'ultimo periodo della gravidanza a un aumento della gluconeogenesi epatica, ma ad una ridotta utilizzazione del glucosio nei tessuti periferici; ad un'invariata o diminuita utilizzazione periferica dell'acetato; ad un moderato aumento della mobilitazione di NEFA (acidi grassi non esterificati) dal tessuto adiposo associato a un simile aumento dell'utilizzazione periferica di NEFA (acidi grassi non esterificati) e del loro metabolismo epatico. (Bell, 1995)

Specifici cambiamenti nel metabolismo degli amminoacidi non sono stati riscontrati ma si può ritrovare un aumento della sintesi proteica e una riduzione del catabolismo degli amminoacidi nel fegato, accompagnato a una maggiore predisposizione alla proteolisi del muscolo.

Tutti questi adattamenti metabolici, osservati o supposti, sono coerenti con quanto sopra descritto; la promozione della disponibilità di glucosio e di amminoacidi per il metabolismo del feto e l'aumento del ricorso al metabolismo ossidativo con i NEFA e i chetoni. Il loro corretto funzionamento sembra stabilire la capacità di mantenere un approvvigionamento di glucosio sufficiente per sostenere la crescita normale del conceptus alla fine della gravidanza (per i dati e la discussione più dettagliata, vedere Bell, 1993), questo nelle vacche moderatamente e non seriamente sottonutrite.

I principali costituenti del latte: lattosio, acidi grassi e proteine, per essere sintetizzati, richiedono un elevato dispendio energetico per la bovina. È stato stimato infatti, facendo un confronto tra le vacche a poche settimane prima dal parto e vacche a poche settimane dopo il parto, che i fabbisogni di glucosio, amminoacidi e acidi grassi richiesti dalla mammella, sono superiori di circa 2,7 volte per il glucosio 2,0 volte per gli amminoacidi e 4,5 volte per gli acidi grassi rispetto a quelli del utero gravidico durante la tarda gravidanza.

Il fabbisogno mammario stimato per la produzione di energia è tre volte quella del utero (Vedi Figura 1.).

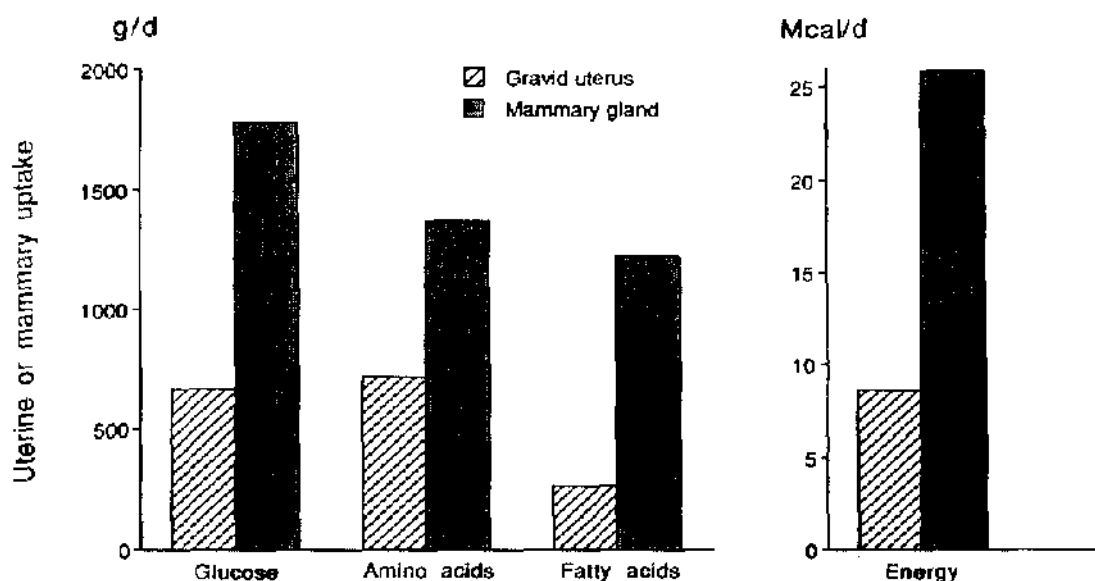


Figura 1 . Comparazione tra i principali nutrienti e l'energia richiesti dall'utero e dal feto prima della gravidanza a 250 giorni di gravidanza e dalla ghiandola mammaria 4 giorni dopo il parto (Adattato da Davis *et al.*, 1979)

In conseguenza dell'incremento dei fabbisogni, è giustificabile l'aumento, tra il secondo e il quinto giorno pre parto e ancor di più, al primo giorno post-partum: dell'afflusso sanguigno alla mammella; del consumo di ossigeno e dell'assorbimento di glucosio e di acetato da parte della mammella. Come evidenziato in Figura 1 (Davis *et al.*, 1979).

Particolare attenzione va posta all'aumento dell'assorbimento di glucosio, che è ben più elevato dell'afflusso sanguigno, del consumo di ossigeno e dell'assorbimento di acetato. L'assorbimento di glucosio mammario, nei giorni post-partum, è nove volte più alto, rispetto all'intervallo tra il settimo e il nono giorno prima del parto e cinque volte superiore rispetto ai due giorni prima del parto (Vedi Figura 2.) (Davis *et al.*, 1979).

L'aumento imponente e repentino della domanda di glucosio e di tutti gli altri elementi, è indice, dell'inizio della copiosa secrezione di latte. Il glucosio, in primis, è necessario per la sintesi di lattosio, lo zucchero principale del latte.

Figura 2. *Andamento del flusso sanguigno, della produzione di latte e dell'assorbimento di glucosio e acetato nel periodo che intercorre tra gli 8 giorni prima del parto e i 6 giorni dopo il parto (Adattato da Davis et al., 1979).*

Come mostrato in Figura 2, anche i fabbisogni di acidi grassi durante le prime settimane di lattazione sono nettamente superiori a quelli presenti durante l'ultima fase della gravidanza. Durante la lattazione, metà degli acidi grassi presenti nel latte derivano dalla sintesi ex novo della mammella a partire dai substrati quali: l'acetato e il 3-idrossibutirrato; la restante parte deriva da trigliceridi e lipoproteine plasmatiche preformate (Bickerstaffe *et al.*, 1974).

Tuttavia, durante la prima fase della lattazione, quando le bovine si trovano in uno stato di bilancio energetico negativo e conseguentemente i livelli circolanti di NEFA sono

relativamente elevati, una parte significativa della sintesi dei grassi del latte avviene a partire dai NEFA (L. Pullen *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1991b). Quanto detto può essere importante, soprattutto durante il primissimo post-partum, quando le concentrazioni plasmatiche di NEFA sono particolarmente elevate (Grummer, 1993).

Le considerazioni fatte sin da ora sui fabbisogni di lattazione, sottolineano che, durante la prima settimana di lattazione, la richiesta energetica, lipidica e amminoacidica, necessaria per sostenere l'elevata produzione che si ha in tale periodo, non sono sufficienti per soddisfare i fabbisogni di produzione. Per sopperire a tale deficit, la bovina attua uno specifico adattamento metabolico volto alla mobilitazione di energia, di proteine e di grassi dai tessuti di riserva.

2.1.3 Ingestione, fabbisogni energetici e strategie alimentari nel post partum

Come raffigurato in Figura 3, all'aumento dei fabbisogni, non corrisponde un altrettanto aumento dell'appetito e quindi dell'ingestione di nutrienti (Spain e Scheer, 2002).

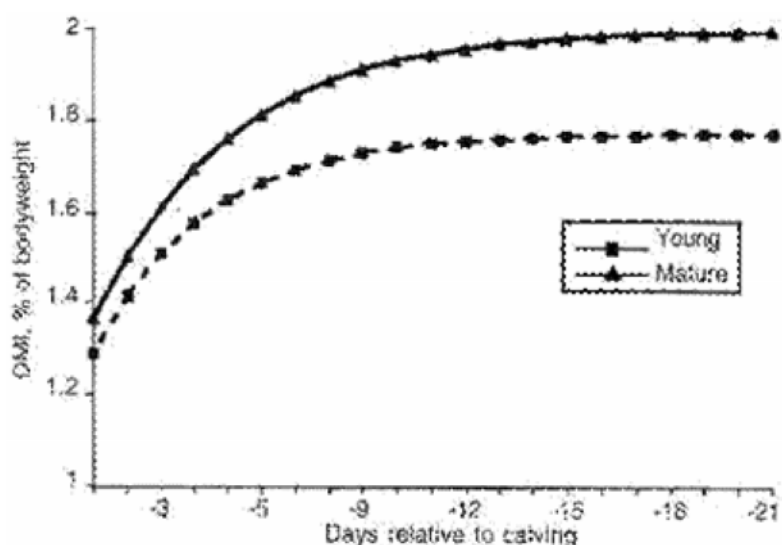


Figura 3 Andamento dell'ingestione nell'ultima fase di gestazione

La diminuzione dell'ingestione di sostanza secca, inizia tre settimane prima del parto e raggiunge, nella settimana prima del parto e quella dopo il parto, il periodo più critico. L'entità di questa riduzione, varia da animale ad animale, ma in media, possiamo affermare che è circa del 30% nelle vacche mature e nelle manze (Coppock *et al.*, 1972; Hernandez

Urdaneta *et al.*, 1976; Johnson e Otterby, 1981; Kunz *et al.*, 1985; Bertics *et al.*, 1992; Emery, 1993; Vazquez-Anon *et al.*, 1994).

Le cause di minor appetenza e della diminuzione di assunzione di nutrienti non sono ancora del tutto note; sembrano essere collegate al cambiamento dell'assetto ormonale, in particolare ai cambiamenti nelle concentrazioni ematiche di estrogeni e progesterone (Grummer *et al.*, 1990).

La diminuzione dell'ingestione di sostanza secca, associata ad un aumento dei fabbisogni, porta la bovina ad un inevitabile bilancio energetico negativo. Per sopperire a tale deficit, la vacca attua delle strategie, in particolare aumenta la mobilitazione di grasso dalle riserve adipose e del glicogeno dalle riserve epatiche (Grummer, 1995).

La fonte energetica prediletta dall'organismo sono i carboidrati, in assenza o carenza di questi l'organismo sopperisce al fabbisogno energetico utilizzando le riserve adipose.

Il deficit energetico caratteristico del periodo di transizione induce un'intensa lipomobilizzazione che si traduce in un aumento a livello ematico della concentrazione di NEFA. Le concentrazioni ematiche di NEFA, aumentano nell'intervallo compreso tra il diciassettesimo ed il secondo giorno prima del parto (Grummer, 1995) con un aumento ancora più consistente durante e subito dopo il parto (Grummer, 1993).

La concentrazione plasmatica dei NEFA è un valore strettamente legato alla lipomobilizzazione, di conseguenza più alta sarà tale concentrazione più intensa sarà l'attività lipolitica (Bauman *et al.*, 1988; Pullen *et al.*, 1989). A sua volta il tasso di NEFA è rappresentativo della mobilitazione di materia grassa dal tessuto adiposo e quindi la perdita di peso corporeo (Dunshea *et al.*, 1988).

Secondo l'equazione di Pullen e coll. (1989), relativa al tasso di ossidazione dell'intero organismo e della concentrazione di NEFA nel plasma, circa il 35% del tasso di NEFA in entrata viene completamente ossidato. Se, come precedentemente osservato, l'assorbimento mammario di NEFA costituisce circa il 40% degli acidi grassi presenti nel latte, approssimativamente la metà dei NEFA immessi nel torrente sanguigno vengono ossidati o incorporati nei trigliceridi del latte (Bell, 1995).

La presenza di NEFA e il loro utilizzo a livello mammario, epatico e tissutale è indispensabile per mantenere un approvvigionamento di glucosio necessario per sostenere la crescita del feto prima del parto e la produzione di latte dopo il parto. Questo ovviamente a scapito delle riserve lipidiche e proteiche della madre (Bell, 1993).

Per limitare l'entità di mobilitazione del tessuto adiposo; la concentrazione ematica di NEFA e aumentare l'assunzione di sostanza secca, nel corso degli anni sono state adottate una

serie di strategie di razionamento ante e post-partum basate sulla qualità degli alimenti; sul tenore di fibra fisicamente efficace; sul rapporto foraggi concentrati, per massimizzare l'attività microbica del ruminale; sull'uso di sostanze prebiotiche e di integratori.

Al giorno d'oggi la strategia alimentare principalmente utilizzata nel pre parto, per massimizzare la capacità ingestiva è lo "steaming up". Con il termine "steaming up", si intende una forzatura alimentare, alla quale la bovina viene sottoposta negli ultimi 15-20 giorni antecedenti il parto (Overton, 2002). L'obiettivo principale dello "steaming up" è quello di abituare gradualmente la flora ruminale dell'animale ad una dieta tipica di lattazione, ben più energetica rispetto a una dieta di asciutta, molto fibrosa. Il progressivo aumento dei concentrati nella dieta e il conseguente incremento della produzione di AGV (acidi grassi volatili), principalmente propionato e butirrato, favoriscono lo sviluppo della papille ruminali.

Con lo "steaming up" dunque è possibile stimolare la crescita della mucosa, ancora prima del parto, cosicché l'aumentata produzione di AGV di inizio lattazione possa essere efficacemente compensata da un adeguato assorbimento, evitando i rischi di acidosi (Spain e Scheer, 2002).

2.1.4 Cambiamenti ormonali nel periodo di transizione

Le risposte metaboliche, attuate dall'organismo materno, per soddisfare l'ingente aumento dei fabbisogni nel periodo di transizione, fino ad ora trattate sono strettamente regolate da alcuni ormoni.

È infatti la concentrazione ematica di alcuni ormoni, assieme alla loro attività sinergica e inibitoria, a favorire la lipolisi piuttosto che la lipogensei, la gulconeogenesi piuttosto che la glicolisi, la produzione e la secrezione di latte, l'induzione del parto e molti altri fenomeni caratteristici di questo periodo. Il fine ultimo degli ormoni è infatti quello di regolare il metabolismo e le risposte fisiologiche al fine di mantenere l'omeostasi.

I principali ormoni che sembrano incidere particolarmente sull'omeostasi e sull'omeoresi (definita da Bauman e Currie (1980), come "l'orchestra o il coordinamento dei cambiamenti metabolici che avvengono nei tessuti del corpo necessari a sostenere uno stato fisiologico [dominante] ") durante il periodo di transizione, sono: gli estrogeni, la prolattina il GH, l'insulina e i glucocorticoidi.

Verso il termine della gravidanza, aumenta la concentrazione plasmatica di estrogeni, prodotti soprattutto a livello placentare. Nelle ultime settimane prima del parto, infatti, la placenta cambia il suo assetto ormonale, favorendo l'espressione di alcuni enzimi chiave (aromatasi) che convertono gli androgeni in estrogeni.

L'aumento di 17β -estradiolo, come mostrato in Figura 4., avviene nell'ultima parte della gravidanza, con un picco a una-due settimane prima del termine gravidico. Gli estrogeni infatti, contrariamente al progesterone, che diminuisce le sue concentrazioni fino a scomparire pochi giorni prima del parto, sono indispensabili per l'induzione del parto medesimo. L'incremento di estrogeni è concomitante con la diminuzione dell'assunzione di nutrienti (Forbes, 1986) e con l'aumento della

lipomobilizzazione, indipendentemente dal bilancio energetico; (Grummer et. al 1990) entrambi eventi caratteristici del periodo di transizione.

L'aumento della prolattina nel pre parto (vedi Figura 4.) è indice della imminente produzione di latte. Infatti, la prolattina è l'ormone che stimola la lattogenesi. Sembra che la prolattina, come il GH sia in grado di modificare le risposte omeoretiche nel tessuto adiposo e negli altri tessuti. La prolattina, come il GH, inibirebbe l'effetto dell'insulina sul tessuto adiposo (vedi recensione, Williamson e Lund, 1994), inoltre influenzerebbe la ripartizione degli amminoacidi assorbiti tra il fegato e tessuti extra epatici (Garcia de la Asuncion *et al.*, 1994).

Un ruolo centrale nella regolazione omeoretica durante il periparto è giocato dal GH (growth hormone) (Bell, 1995). Nei ruminanti, in particolare, è stato dimostrato che il GH più della prolattina esercita una potente azione galattopoietica dopo il parto (Bauman e Elliot, 1983; Bauman e Vernon, 1993). Come mostrato il figura 4 durante l'ultimo periodo di gestazione, il GH aumenta fino al momento del parto dove raggiunge il picco massimo.

È stato dimostrato da Bauman e Vernon (1993), che il GH ha un effetto diretto sulla diminuzione della lipogenesi poiché diminuisce l'attività degli enzimi lipogenici nel tessuto adiposo. Questo effetto è contrario a quello attuato dall'insulina, infatti, livelli elevati di somatotropina favoriscono gli antagonisti dell'insulina determinando quindi una diminuzione della concentrazione ematica di insulina (Hart *et al.*, 1978). Il GH quindi favorisce la lipolisi. Il trattamento cronico con somatotropina ha evidenziato infatti un aumento significativo della responsività lipolitica (Sechen *et al.*, 1990).

L'aumento della concentrazione ematica di GH favorisce inoltre la gluconeogenesi epatica (Pocius e Herbein, 1986; Knapp *et al.*, 1992), probabilmente attraverso la diminuzione della capacità dell'insulina di inibire la gluconeogenesi (Boisclair *et al.*, 1989).

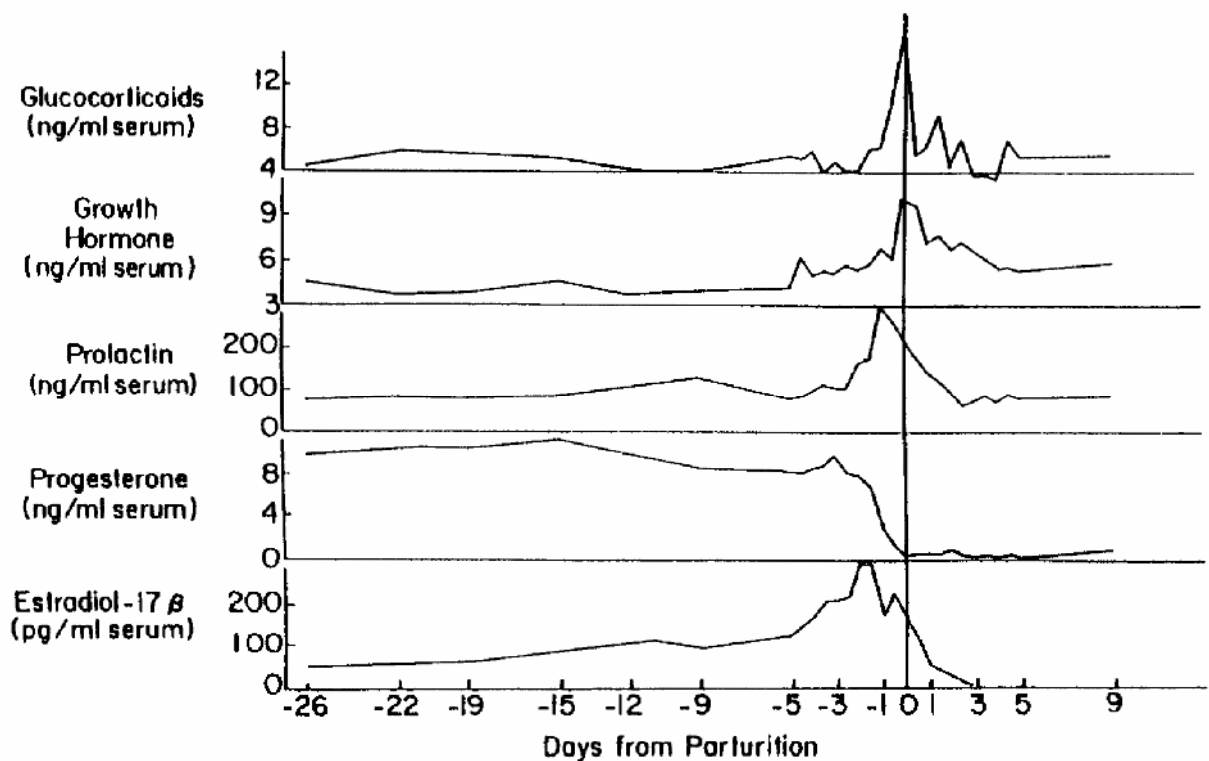


Figura 4. Andamento dei principali ormoni coinvolti nel metabolismo di vacche da latte durante il periodo di transizione (Tucker, 1985).

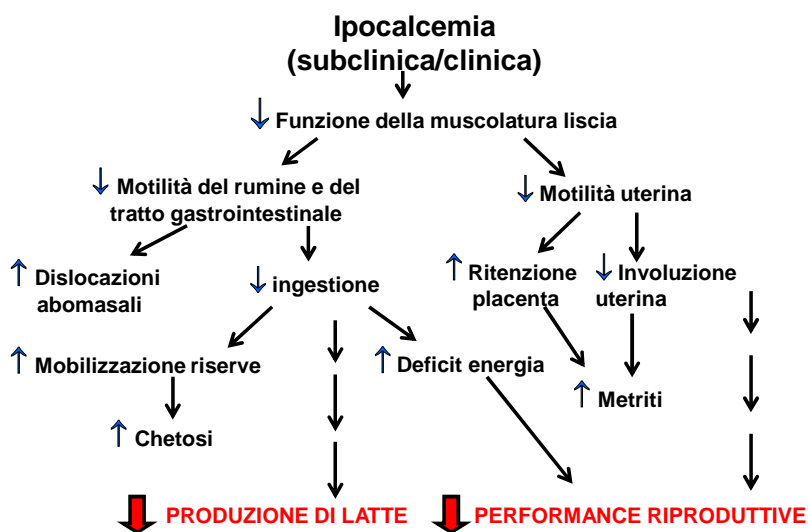
La diminuzione della concentrazione ematica dell'insulina, durante il periodo del periparto, dovuta anche all'azione anti-insulinica della somatotropina (Hart *et al.*, 1978), favorisce la mobilizzazione di grassi dal tessuto adiposo, di NEFA e di amminoacidi nonché il risparmio di glucosio (Vernon *et al.*, 1990; Faulkner e Pollock, 1990; Debras *et al.*, 1989). Infatti la quasi totale soppressione della lipogenesi, dopo l'inizio della lattazione è associata a bassi livelli di insulina (Hart *et al.*, 1978) e alla perdita da parte del tessuto adiposo della responsività (Rmax: risposta massima data da un determinato ormone) a questo ormone.

2.1.5 Le patologie del periparto

Il calcio rappresenta uno dei principali costituenti minerali presenti nel latte e nel colostro. L'elevata deplezione che si verifica con la secrezione mammaria, in particolar modo nelle BLUP (bovine ad alta produttività), crea uno stato di ipocalcemia più o meno accentuato. Tra le varie funzioni metaboliche di questo minerale, particolare importanza è rivestita dal meccanismo di contrazione muscolare. Uno stato di ipocalcemia interferisce negativamente

sul suddetto meccanismo con ripercussioni sulla muscolatura liscia e striata (Aguggini *et al.*, 1998).

Figura 5. Effetto dell'ipocalcemia sul periodo postpartum



Classicamente l'ipocalcemia viene distinta in una forma clinica e subclinica. Il riscontro di ipocalcemia clinica si verifica nel momento in cui i livelli ematici del Ca^{2+} scendono al di sotto dei 5mg/dl, mentre in condizioni fisiologiche è compreso tra 9-12 mg/dl (NRC, 2001). Gli effetti di una simile condizione sulla contrattilità muscolare provocano nell'animale una difficoltà deambulatoria se non addirittura l'impossibilità di mantenere la stazione quadrupedale. L'instaurarsi della rapida produzione latte determina una diminuzione della concentrazione sierica di Ca^{2+} inducendo di conseguenza una minor utilizzazione del Ca^{2+} a livello sistemico. Questo porta a un sindrome nota come "collasso puerperale" che consiste in una paralisi flaccida e/o stato di sonnolenza acuto o iperacuto. In termini di incidenza, il collasso puerperale, non costituisce più la principale problematica legata alla gestione dell'animale dopo il parto. In passato, l'ipotesi che l'ipocalcemia potesse avere delle ripercussioni sull'animale anche in assenza di manifestazioni evidenti, non era concepita.

La maggiore attenzione che oggi invece viene data alle forme subclinica dell'ipocalcemia rappresenta il frutto di una serie di studi svolti in materia (Van Horn e Wilcox, 1992; Spain e Scheer, 2002); i quali sottolineano la potenziale pericolosità dei risultati sul piano metabolico di un simile quadro carenziale. Proprio per il fatto di non essere sintomatiche, queste dismetabolie tendono ad essere trascurate o comunque a non essere individuate con la necessaria tempestività, e possono contribuire all'instaurarsi di altre patologie come di seguito riportato.

Tabella 1. Influenza dell'ipocalcemia sul rischio di altri disordini metabolici del periparto⁽¹⁾

Patologia	Odds ratio	P<
Distocia	2.8	<0.0001
Ritenzione placentare	6.5	<0.0001
Dislocazione sx abomaso	3.4	0.06
Chetosi	8.9	<0.0001
mastiti	8.1	<0.0001

¹Adattato da Curtis e coll., 1993

Chetosi. La chetosi rappresenta uno dei disordini metabolici che più spesso si manifestano nel periodo di transizione, con possibile interessamento in talune realtà aziendali di un elevato numero di capi. Alcuni studi hanno riscontrato un evidente aumento dei NEFA a livello ematico nelle due settimane precedenti il parto, creando i presupposti all'insorgenza di una steatosi epatica a cui frequentemente segue una forma di chetosi. In altri casi si è evidenziato un aumento significativo dei corpi chetonici in circolo già prima del parto (Grummer, 1993). La chetosi sembra essere correlata ad una ridotta contrattilità a livello prestomacale, quale esito di uno stato ipocalcémico. Una simile situazione può infatti penalizzare l'ingestione, aggravando ulteriormente il bilancio energetico negativo, già presente nella bovina in tale fase. Le conseguenze si manifestano nella perdita di appetito, in un calo della produzione di latte e nella perdita di peso, con riflessi negativi anche sulla sfera riproduttiva (Spain e Scheer, 2002)

Dislocazione dell'abomaso. La dislocazione dell'abomaso è una patologia di crescente interesse negli allevamenti ad alta produzione, con riscontro di incidenze medie del 3.3% (seppur passibili di variazione tra lo 0 e il 44%) (Fourdraine, 1993). Un declino della calcemia è associato ad una lineare riduzione della contrattilità abomasale responsabile dell'atonìa e della distensione del viscere. Valori di Ca ematico di 5mg/dl riducono la motilità del 70% e la forza di contrazione abomasali del 50; mentre a concentrazioni di Ca pari a 7.5%, motilità e contrattilità diminuiscono rispettivamente del 30 e 25% (NRC, 2001).

Ritenzione della placenta e metriti. La mancata espulsione degli invogli fetali è un fenomeno di origine multifattoriale. L'espletamento del secondamento è un processo correlato alla contrattilità del miometrio, perciò un'ipocalcemia anche in forma subclinica può interferire negativamente. La ritenzione della placenta, qualora non trattata, porta frequentemente allo

sviluppo di infezioni uterini che si riflette sulle successive performance riproduttive della bovina (NRC, 2001).

Mastiti. Bovine colpite da ipocalcemia presentano livelli di cortisolo elevati per periodi elevati che possono esacerbare lo stato di immunodepressione tipicamente presente nel parto. La compromissione della risposta immunitaria associata alla mancata chiusura dello sfintere del capezzolo dopo la mungitura può aumentare il rischio di mastite post-partum.

2.2 IL SISTEMA IMMUNITARIO

2.2.1 Generalità

Il sistema immunitario di tutti i vertebrati, fra i quali il bovino, è un sistema dinamico e complesso che ha il compito di proteggere l'organismo dai microrganismi patogeni quali batteri, virus, funghi e protozoi e dai parassiti metazoi. La funzione fisiologica del sistema immunitario è quella di prevenire le infezioni e di eradicarle una volta che esse si sono stabilite nell'organismo. Per adempire a questa funzione l'organismo si avvale di diverse tipi di cellule (linfociti, cellule NK e macrofagi), tessuti (cute e mucose) e molecole (anticorpi, citochine e fattori umorali) che nel loro insieme prendono il nome di "sistema immunitario". In seguito all'incontro di queste cellule e molecole con gli agenti infettivi si attiva una serie di reazioni a catena che nel loro insieme costituiscono la risposta immunitaria (Halliwell R.E.W e Gorman N.T., 1989; Morrison W.I., 1986; Poli G *et. al.*, 1996; Lippolis *et. al.*, 2007).

Sebbene l'immunologia sia nata inizialmente come studio delle difese nei confronti dei processi infettivi, è stato successivamente chiarito che le reazioni immunologiche non sono necessariamente innescate da un'infezione. Esse sono invece più generalmente dirette al mantenimento dell'organismo altrimenti sottoposto a influenze interne ed esterne che tenderebbero a modificarne l'integrità e l'identità (Halliwell R.E.W e Gorman N.T., 1989; Morrison W.I., 1986; Poli G *et. al.*, 1996).

I meccanismi di difesa dell'ospite comprendono l' "immunità innata" che media un'iniziale protezione nei confronti delle infezioni e l' "immunità acquisita" la quale si sviluppa più lentamente mediando una fase più tardiva e peraltro più efficace della difesa contro gli agenti infettivi. Il termine "innata" o "naturale" si riferisce al fatto che questo sistema di difesa è sempre operativo nell'ospite e pronto a bloccare l'ingresso dei microbi nell'organismo, eliminando rapidamente gli agenti patogeni che eventualmente sono riusciti ad entrare nell'ospite.

Il termine "acquisita" o "specificata" è riferito invece quel sistema di difesa che viene stimolato dagli agenti infettivi che invadono i tessuti dell'ospite (Abbas A. K. e Lichtman A. H., 2001; Lichtman Halliwell R.E.W e Gorman N.T., 1989; Morrison W.I., 1986; Poli G *et. al.* 1996).

La prima linea dell'immunità innata è costituita: dalle barriere epiteliali come cute e mucose, da elementi cellulari "specializzati" ad attività fagocitaria (come ad es. granulociti neutrofili e i macrofagi) deputati all'ingestione e alla distruzione degli aggressori nonché da fattori umorali diversi, dotati comunque di attività antimicrobica.

Questi sistemi, oltre a fornire una prima difesa nei confronti dell'infezione potenziano le risposte immunitarie acquisite. Non sono tuttavia specifici perché non rivolti verso un tipo di sostanza estranea definita, e non sono quindi in grado di discriminare tra il materiale estraneo inerte e i microrganismi patogeni (Abbas A. K. e Lichtman A. H., 2001).

Nel caso in cui l'agente patogeno aggressore riesca a superare queste prime difese, si attivano meccanismi di "secondo intervento", altamente specifici che vanno a costituire la "seconda linea di difesa" dell'organismo detta anche immunità acquisita o specifica. L'immunità acquisita si sviluppa più lentamente rispetto all'immunità innata e media una fase più tardiva e più efficace della difesa contro gli agenti infettivi. Essa è costituita da elementi cellulari, i linfociti T e B e da alcuni loro prodotti, gli anticorpi le citochine e alcuni fattori umorali. Le cellule che costituiscono l'immunità acquisita hanno la peculiarità di essere altamente specifiche e selettive nei confronti dell'agente estraneo. Esse infatti esprimono sulla loro membrana recettori che riconoscono in maniera specifica i prodotti dei differenti microbi, vengono quindi attivate quando il patogeno (es. batterio o virus), è riuscito a superare le prime difese non specifiche (Goodeeris B. *et al.*, 1996; Halliwell R.E.W e Gorman N.T. 1989; Morrison W.I., 1986; Poli G *et. al* 1996).

Per quanto riguarda l'immunità acquisita distinguiamo due diversi meccanismi di azione: l'immunità umorale e l'immunità cellulo-mediata.

Più precisamente, si parla di immunità umorale quando la risposta difensiva si esplica tramite la sintesi da parte dei linfociti B di molecole (anticorpi o immunoglobuline) presenti in forma libera nel torrente circolatorio e nelle varie secrezioni. Si parla invece di risposta immunitaria cellulo-mediata, quando la risposta difensiva si realizza attraverso l'attivazione e l'amplificazione clonale di cellule citotossiche che distruggono l'agente estraneo o la cellula infetta, direttamente o indirettamente attraverso meccanismi che coinvolgono prodotti solubili (cioè le citochine) e altri tipi cellulari ad attività fagocitaria (Poli *et. al.*, 1996).

Riassumendo l'immunità acquisita differisce da quella naturale per le seguenti caratteristiche:

- Specificità: permette di riconoscere moltissimi agenti patogeni differenti
- Memoria: potenzia la risposta verso infezioni persistenti o recidivanti
- Specializzazione: le risposte verso i diversi patogeni si diversificano così da consentire che contro ognuno di essi si sviluppi la risposta più efficiente
- Mancata reattività verso gli antigeni autologhi: Previene risposte immunitarie potenzialmente dannose contro le cellule e i tessuti dell'ospite (Abbas A. K., e Lichtman A. H., 2001).

Il sistema immunitario regola la quantità e la qualità della sua stessa risposta in base alla natura dell'agente patogeno. A seconda dei casi può prevalere la risposta umorale (per esempio nell'inattivazione di tossine o nella distruzione di microrganismi liberi nel torrente circolatorio), oppure la risposta cellulo-mediata (per esempio nel distruggere i microrganismi intracellulari, le cellule tumorali o i tessuti trapiantati). In ogni caso, nella maggior parte delle malattie infettive e neoplastiche i due sistemi interagiscono fra di loro dando vita a un unico "sistema integrato".

Le interazioni cooperative fra cellule e sostanze solubili contribuiscono alla protezione immunitaria "non specifica" (innata) e a quella specifica (acquisita), sia umorale che cellulo-mediata (Poli *et. al.*, 1996).

Un corretto equilibrio fra le varie componenti del sistema immunitario e gli agenti provenienti dall'esterno fa sì che l'animale risponda positivamente agli attacchi esterni e mantenga così un stato di salute ottimale.

2.2.2 Le cellule del sistema immunitario: linfociti, fagociti, neutrofilo e monociti.

I leucociti o globuli bianchi giocano un ruolo fondamentale nella difesa dell'organismo contro l'attacco di agenti patogeni. Essi rappresentano infatti le cellule del sistema immunitario per eccellenza, perché sono le uniche dotate di recettori specifici per gli antigeni. I linfociti evocano una risposta immunitaria specifica, si attivano solamente in seguito alla penetrazione di un agente e al legame di una porzione dell'agente patogeno (antigene) con i globuli bianchi. L'antigene provoca una serie di eventi cellulari complessi che ne facilitano l'eliminazione e agiscono sulle cellule effettrici regolando la natura e l'intensità della risposta immunitaria.

Possiamo distinguere fra tre principali classi di linfociti: i natural killer (NK) che intervengono nella immunità innata, i linfociti T che regolano l'immunità acquisita e sono responsabili dell'immunità cellulo-mediata e non ultimi i linfociti B che sono responsabili della produzione di anticorpi. All'interno di queste vaste categorie rientrano varie sottopopolazioni linfocitarie che hanno differenti caratteristiche e funzioni (Tizard I., 1992).

I linfociti sono piccole cellule (7-15 μm di diametro), quasi prive di reticolo endoplasmatico, caratterizzate da un nucleo sferico e da una piccola quantità di citoplasma contenente pochi organuli cellulari. Rappresentano circa il 30% dei leucociti del sangue e circa l'1% del peso totale corporeo (Poli *et. al.*, 1996; Tizard I., 1992). Si distribuiscono in tutto l'organismo

costituendo un pool di linfociti circolanti e sono particolarmente diffusi negli organi linfatici, che nei mammiferi sono il timo e gli organi linfoidi periferici.

I linfociti sono simili tra loro da un punto di vista morfologico ma sono estremamente eterogenei sotto il profilo ontogenetico, funzionale e fenotipico, e sono capaci di risposte biologiche e funzionali estremamente complesse (Abbas A. K., e Lichtman A. H., 2001). Possono essere identificati in base all'espressione sulla loro superficie di proteine riconosciute da un gruppo di anticorpi monoclonali, chiamati immunofenotipi, attraverso i quali è possibile identificare le numerose sottopopolazioni linfocitarie (Tizard I., 1992; Teale, 1987). Queste proteine hanno funzioni diverse e vengono classificate tramite il sistema di nomenclatura CD ossia *cluster of differentiation*. Per ciascuna molecola alla sigla CD segue un numero identificativo delle proteine di superficie che caratterizzano un ben preciso stadio di differenziamento della cellula.

I linfociti T

I linfociti T originano dal midollo osseo, maturano nel timo e durante la maturazione attraversano vari stadi che si possono distinguere in base ai recettori (markers) espressi sulle membrane cellulari in superficie.

La struttura più importante presente sulle superfici dei linfociti T è il recettore per l'antigene: il cosiddetto "T cell receptor" o TCR. Tale recettore è molto complesso in quanto strettamente aggregato ad altre proteine di superficie: la CD3 presente su tutti i linfociti T e responsabile della trasmissione dei "segnali" all'interno della cellula, oppure le CD4+ o CD8+ a seconda che i linfociti T siano "helper" o "citotossici/suppressori".

Il recettore TCR è un etero dimero formato da una catena α e una β (/ TCR) oppure da una catena γ e una δ (/ TCR) entrambe associate a una serie di peptidi che nel loro insieme sono appunto denominati CD3 (Poli *et al.*, 1996; Abbas A. K. e Lichtman A. H., 2001).

Nelle specie non ruminanti e nei primati il 95-99% dei linfociti T veicola recettori α/β , mentre il restante 1-5% veicola recettori γ/δ . I ruminanti si differenziano dalle altre specie poiché il 30-60% dei linfociti T veicola recettori α/β (Poli *et al.*, 1996; Tizard I., 1992; Kimura K., *et al.*, 1999).

Il recettore per l'antigene dei linfociti T riconosce esclusivamente frammenti peptidici degli antigeni proteici legati a molecole specializzate nel presentare l'antigene, chiamate anche molecole del "complesso maggiore di istocompatibilità" (MHC), a loro volta espresse sulla membrana di cellule specializzate denominate "cellule che presentano l'antigene" (APC, Antigen Presenting Cells).

Una volta che l'antigene presente nelle APC va a legarsi al TCR questo si attiva e inizia a secernere diverse proteine regolatrici chiamate citochine, le quali mediano l'infiammazione e la risposta immunitaria. Le principali funzioni delle citochine sono:

- ✓ Promuovere la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T
- ✓ Regolare la qualità e il livello della risposta immunitaria
- ✓ Attivare i macrofagi e gli eosinofili (Abbas A. K. e Litchman A. H., 2001).

L'avvio della risposta da parte dei linfociti T richiede che numerosi TCR interagiscano con i ligando espressi dalle APC: il TCR riconosce infatti i peptidi antigenici associati all'MHC. Il corecettore CD4 riconosce le molecole MHC di classe II mentre il corecettore CD8 quelle di classe I. Le molecole di adesione rafforzano il legame del linfocita T alle APC mentre i costimolatori riconoscono i segnali provenienti dalle APC.

I linfociti T sono geneticamente programmati per dare origine a sottopopolazioni diverse, sia per funzioni, sia per la presenza di "markers" di membrana differenti. Si riconoscono infatti due principali sottopopolazioni:

1. I linfociti T helper CD4⁺
2. I linfociti T citotossici/ sopressori CD8⁺ (Poli *et. al.*, 1996)

I linfociti T helper detti anche CD4⁺ esprimono il fenotipo CD4⁺ CD8⁻ e costituiscono circa un terzo della popolazione di cellule T mature. I linfociti T helper presentano il corecettore CD4 associato al complesso TCR che riconosce soltanto le molecole MHC di classe II espresse sulle APC.

Il compito principale dei linfociti T helper consiste nell'amplificare la funzione di altre cellule: essi infatti favoriscono la produzione e la secrezione di anticorpi da parte dei linfociti B, inducono i linfociti citotossici a differenziarsi in cellule effettrici e infine stimolano i macrofagi e altre cellule non specifiche a intervenire nelle reazioni di ipersensibilità ritardata. Proprio per questo sono chiamati "helper", perché aiutano e supportano la risposta immunitaria cellulo-mediata (Poli *et. al.* 1996, Abbas A. K., et Litchman A. H., 2001).

I linfociti T helper CD4⁺ possono differenziarsi in sottopopolazioni di cellule effettrici che producono citochine diverse dotate di differenti funzioni. Più precisamente, i linfociti T helper 1 (Th1) producono principalmente l'INF- il quale stimola le cellule citotossiche e attiva i macrofagi, promuovendo soprattutto la risposta immunitaria cellulo-mediata. I linfociti T helper 2 (Th2) producono prevalentemente IL-4 e IL-5 che stimolano la proliferazione dei

linfociti B e quindi la sintesi delle diverse classi anticorpali, promovendo quindi la risposta immunitaria di tipo umorale (Poli *et al.* 1996, Abbas A. K. e Litchman A. H., 2001).

I linfociti T citotossici/soppressori esprimono il fenotipo CD4⁻ CD8⁺ e presentano il corecettore CD8 associato al complesso TCR che riconosce le molecole MHC di classe I espresse sulle APC (Abbas A. K. e Litchman A. H., 2001).

Una volta attivati in seguito al legame dell'antigene con i costimolatori o i linfociti T "helper", i CD8⁺ si trasformano in linfociti T citotossici (CTL), capaci di distruggere specificatamente le cellule infette che presentano quell'antigene. Più precisamente i CTL da un lato lisano le cellule allogeniche (provenienti da altri individui) che veicolano antigeni di istocompatibilità di classe I diversi dai propri, dall'altro distruggono le cellule sinergiche, ossia le cellule che presentano gli stessi antigeni di istocompatibilità che siano però stati modificati nella loro struttura da un virus o da una trasformazione neoplastica.

È inoltre opportuno ricordare che i linfociti T citotossici svolgono un importante ruolo nel controllo e nel funzionamento del sistema immunitario in quanto sono deputati a sopprimere, direttamente o attraverso fattori solubili, l'attività di altre cellule immunitarie quali i linfociti B, alcuni tipi di linfociti T e i macrofagi (Poli *et al.* 1996; Tizard I., 1992).

Più specificatamente per quanto riguarda i bovini, possiamo individuare un'altra importante sottopopolazione linfocitaria che interviene nella risposta immunitaria cellulo-mediata: i WC1⁺. La nomenclatura WC sta per "workshop cluster" e indica particolari proteine specie-specifiche presenti nella superficie cellulare dei linfociti bovini. La molecola WC1 è una singola catena di tipo 1 di glicoproteine presente nel 90% delle cellule T / . Nei bovini le cellule T WC1⁺ sono maggiormente presenti nella pelle e nelle mucose, come nei linfonodi (hemal nodes) e nel timo. Il ligando naturale del WC1⁺ non è ancora conosciuto. Probabilmente esso si lega ai macrofagi e alle cellule dendritiche e ha una funzione simile ai CD4⁺ e CD8⁺ (Tizard I., 1992).

La valutazione della concentrazione delle diverse popolazioni e sottopopolazioni linfocitarie fornisce preziose indicazioni dello stato funzionale del sistema immunitario di un soggetto e può chiarire alcune situazioni cliniche nei soggetti infetti. Per esempio un'aumentata reattività dei linfociti CD4⁺ (cioè "helper") suggerisce un'aumentata reattività linfocitaria, mentre un aumento dei linfociti CD8⁺ (cioè "suppressor") indica uno stato di immunodepressione. Si è osservato infatti che la percentuale di CD4⁺ nel sangue, era marcatamente minore negli animali clinici che in quelli sani (Koets *et al.*, 2002). Anche il rapporto CD4/CD8 si è visto essere minore negli animali infettati cronicamente rispetto a quelli sani (Koets *et al.*, 2002). La diminuzione della percentuale di CD4 e del rapporto CD4/CD8, osservata da Koets e coll.,

(2002), negli animali clinici rispetto a quelli sani evidenzia il ruolo chiave dei linfociti T-helper nell'attivazione e nell'espletazione della risposta immunitaria, sia umorale che cellulo-mediata. Proprio per questo il rapporto CD4/CD8 può essere usato come indice della funzionalità linfocitaria (Tizard I., 1992; Poli *et. al.*, 1996).

I linfociti B

I linfociti B originano dal midollo osseo (nella maggior parte dei mammiferi), nelle placche del Peyer (nei ruminanti) oppure nella borsa di Fabrizio (nei volatili). I linfociti B sono le uniche cellule in grado di produrre anticorpi, e rappresentano quindi le cellule che mediano l'immunità umorale. I linfociti B esprimono sulla loro superficie particolari molecole, gli anticorpi detti anche immunoglobuline che sono classificate in 5 diverse classi IgM, IgG, IgA, IgE, IgD. In seguito al legame antigene-anticorpo il linfocita B si differenzia in plasmacellula che sintetizza e secerne una grande quantità di anticorpi specifici per l'antigene: antigeni solubili ed antigeni fissati sulla superficie di batteri o di altre cellule possono quindi legarsi a tali recettori, avviando così la risposta umorale (Abbas A. K., e Lichtman A. H., 2001; Poli *et. al.*, 1996).

Le cellule Natural Killer

La terza classe dei linfociti è rappresentata dalle cellule Natural Killer che si differenziano dai linfociti T e B poiché sono privi dei "markers" tipici di quest'ultimi. Le cellule Natural Killer esplicano un'azione citotossica diretta e immediata nei confronti di cellule bersaglio, producendo l'interferone- γ , la citochina che attiva i macrofagi per eccellenza. L'attività citotossica di queste cellule si manifesta indipendentemente dalle presenza di anticorpi o da un'iniziale stimolazione antigenica proprio per tale motivo queste cellule appartengono all'immunità innata poiché sono aspecifiche (Abbas A. K., e Lichtman A. H., 2001; Poli *et. al.*, 1996).

Monociti, fagociti e neutrofil

Come già sopracitato sono presenti all'interno dell'organismo dei meccanismi di difesa aspecifici che rientrano nella cosiddetta immunità innata o naturale, categoria della quale fanno parte i monociti, i fagociti e i granulociti neutrofil. I neutrofil e i monociti sono i principali fagociti circolanti. Vengono reclutati nei focolai infettivi dove inglobano i microrganismi, per poi ucciderli all'interno del loro citoplasma.

I neutrofili chiamati anche leucociti polimorfonucleati (PMN), sono prodotti dal midollo osseo e una volta maturati passano nel sangue dove persistono per qualche alcune ore e vengono successivamente eliminati attraverso il tratto gastrointestinale (Poli *et. al.*, 1996).

I neutrofili presenti nel sangue fagocitano gli agenti patogeni circolanti e migrano rapidamente nei tessuti (chemiotassi), richiamati da sostanze chemiotattiche nel caso di infezione o infiammazione, ove esplicano la loro attività fagocitaria andando poi incontro a morte entro poche ore. La produzione di polimorfonucleati è stimolata dalle citochine, prodotte dalle varie cellule in risposta alle infezioni, le quali stimolano il midollo osseo ad aumentare la proliferazione e la maturazione dei neutrofili. I neutrofili sono il primo tipo cellulare chiamato in causa nella maggior parte delle infezioni, in particolare quelle batteriche e fungine (Poli *et. al.* 1996; Tizard I., 1992).

I monociti invece sono presenti in numero minore rispetto ai neutrofili e anch'essi inglobano agenti patogeni presenti in circolo e nei tessuti. Diversamente dai neutrofili però i monociti che penetrano nei tessuti extravascolari e che vi permangono si differenziano diventando macrofagi.

I macrofagi hanno una vita media abbastanza lunga (circa 75 gg e oltre) e sono localizzati in molti tessuti e organi. Anch'essi come i polimorfonucleati originano dal midollo osseo, successivamente passano nel sangue come monociti per poi diventare macrofagi nei tessuti acquistando una maggiore attività fagocitaria.

2.3 IL SISTEMA IMMUNITARIO NEL PERIODO DI TRANSIZIONE

Il “periodo di transizione” rappresenta il momento più delicato di tutto il ciclo produttivo della bovina e quello dove più di frequente si verificano problemi sanitari quali: ritenzioni di placenta, metriti, collassi, tetanie, dislocazioni abomasali, chetosi, steatosi, mastiti, ecc. (Jordan et Fourdraine, 1993; Bertoni e Trevisi, 1997). In questa fase, infatti, è frequente un calo delle difese immunitarie per ragioni fisiologiche quali lo stress e la modificazione dell’assetto ormonale, per difetti alimentari e per l’insorgenza di stati infiammatori connessi con le fasi terminali della gravidanza e con il parto (Bertoni, 2003). L’immunosoppressione, caratteristica del periodo di transizione, si manifesta con un’ampia gamma di disfunzioni immunologiche, comprese l’indebolimento delle funzioni dei neutrofili e dei linfociti (Kehrli *et al.*, 1989b; Shuster *et al.*, 1996; Mehrzad *et al.*, 2001).

Come parte del sistema immunitario innato, i neutrofili intervengono a mediare la risposta alle infezioni e sono considerati essenziali per un’efficace eliminazione dei batteri dalla ghiandola mammaria (Mollinedo *et al.*, 1999; Smith, 2000; Paape *et al.*, 2003; Zychlinsky *et al.*, 2003). I neutrofili posseggono vari meccanismi per l’uccisione degli agenti patogeni (Smith, 2000; Segal, 2005); quando incontrano dei batteri li fagocitano, racchiudendoli all’interno di fagosomi che si fondono poi con i lisosomi. Questo processo stimola i neutrofili a produrre grandi quantità di agenti ossidanti attraverso un processo denominato “scoppio respiratorio”, durante il quale sono generati i radicali dell’ossigeno, che servono come precursori di vari ossidanti antimicrobici. In aggiunta agli agenti ossidanti, i neutrofili contengono numerose proteine antimicrobiche racchiuse in piccoli granuli, quali: idrolasi, proteasi, lattoferrina e lisozima. Queste proteine una volta liberate nei fagosomi o nell’ambiente extracellulare, distruggono gli agenti patogeni. I meccanismi di difesa appena descritti sono soppressi durante il periodo del periparto (Kehrli *et al.*, 1989b; Shuster *et al.*, 1996; Mehrzad *et al.*, 2001). Anche l’attività dei linfociti come la produzione di anticorpi e di citochine, la citotossicità e la proliferazione risultano chiaramente compromesse (Kehrli *et al.*, 1989a; Ishikawa *et al.*, 1987, Kashiwazaki *et al.*, 1985; Nagahata *et al.*, 1988; Saad *et al.*, 1989).

Un buon funzionamento del sistema immunitario, risulta essere di fondamentale importanza per difendere l’organismo dalle infezioni essenziale per la resistenza dell’ospite alle infezioni. Di conseguenza una diminuzione della funzione dei PMN (linfociti polimorfonucleati) (Guidry *et al.*, 1976; Kehrli *et al.*, 1989b; Newbould, 1976; Nagahata *et al.*, 1988) può determinare un aumento dell’incidenza della patologie tipiche del post-partum in particolare la mastite (Heyneman *et al.* 1990; Zecconi *et al.* 1994).

2.3.1 Il sistema immunitario e l'asse neuroendocrino

Sebbene una serie complessa di interazioni regolano i meccanismi di difesa dell'ospite, l'asse neuroendocrino ha una maggiore influenza sul sistema immunitario. (Griffin, 1989; Park, 1992). Durante il periodo del periparto, sono rilasciati dalla ghiandola pituitaria anteriore, numerosi ormoni riproduttivi, dello stress e regolatori, i quali a loro volta vanno a stimolare altri organi endocrini o tessuti bersaglio, compresi quelli del sistema immunitario.

I glucocorticoidi, per esempio, sono stati a lungo noti per la loro azione soppressiva nei confronti della risposta immunitaria ritardando la guarigione delle ferite e diminuendo il numero di linfociti circolanti (Griffin 1989). Uno studio di Burton e coll. (1995), ha dimostrato che il cortisolo, il glucocorticoide per eccellenza, determina la perdita dell'espressione della proteina CD62L presente sulla superficie dei neutrofili. La proteina CD62L espressa sulla superficie cellulare delle cellule immunitarie tra cui i neutrofili è necessaria per la tras migrazione delle cellule immunitarie dal torrente vascolare al sito dell'infezione; pertanto la mancata espressione di questa proteina determina l'incapacità della cellule di attraversare l'endotelio vascolare e di esplicare la loro azione immunitaria.

Il cortisolo, il GH e le IGF-I invece contribuiscono alla variazione della risposta proliferativa dei PBL (Peripheral Blood Lymphocyte) nel periodo che intercorre tra le tre settimane prima del parto e la tre settimane dopo il parto (Wagter *et al.*, 1996). Mentre il GH e le IGF-I sono correlati alla risposta blastogenica dei PBL (Burton *et. al.*, 1991; Chang *et. al.*, 1996).

Di conseguenza, stress fisici e metabolici durante la gravidanza, il parto, e l'allattamento associati a un alterazione dei profili neuroendocrini influiscono negativamente sulla risposta del sistema immunitario nel periodo di transizione.

2.3.2 Il sistema immunitario e l'alimentazione

Un ruolo significativo nella modulazione della risposta immunitaria durante il periparto sembra essere giocato dall'alimentazione e in particolare dall'inadeguata disponibilità di energia, proteine, vitamine e oligominerali (Persson e Waller 2000; Calder, 2000; Chandra, 1991; Grimble, 1998; O'Flaherty e Bouchier-Hayes, 1999).

Gli oligoelementi svolgono ruoli nutrizionali essenziali; selenio, rame, ferro, zinco e manganese, a vario titolo intervengono nei meccanismi di difesa cellulare ed extracellulare (Morgante *et al.*, 1997). Anche il cromo, il cui uso non è attualmente consentito in Italia, esplica una marcata azione immunostimolante come dimostrano numerose sperimentazioni.

Le vitamine in particolare la vitamina E, C e i carotenoidi invece svolgono un'azione antiossidante, particolarmente importante durante questo periodo. Il periparto infatti è caratterizzato da un intenso *stress* ossidativo (traumi, infezioni batteriche o virali intensificazione delle attività metaboliche anche in seguito a stress ambientali) dovuto alla liberazione di radicali liberi da parte delle cellule immunitarie (Calderone *et al.*, 1998). L'inadeguata disponibilità di alcune vitamine (A ed E) alcuni oligoelementi (Se, Cu e Zn), durante il periodo di transizione influenzerebbe negativamente la risposta immunitaria (Persson e Waller, 2000).

Inoltre, gli alti livelli di NEFA (acidi grassi non esterificati) sembrano avere un effetto inibente sulla immunità umorale e cellulare, mentre il BOHB (acido β -idrossibutirrico) e la lipidosi avrebbero in particolare effetto negativo sui neutrofili (Bernabucci *et al.*, 2002; Lacetera *et al.*, 2002).

Queste osservazioni pongono in risalto il fatto che l'alimentazione ha una sua rilevanza nel modulare il sistema immunitario, ma al tempo stesso che non è unicamente il razionamento in sé ad interferire con la disponibilità dei nutrienti essenziali al sistema immunitario (Bertoni, 2003).

2.3.3. Il sistema immunitario e l'infiammazione

Bertoni e coll. (2000), individuano nell'aumento delle citochine uno dei principali fattori predisponenti le patologie che colpiscono la vacca nel periodo di transizione. Le citochine sono mediatori cellulari del sistema immunitario e sono rilasciate a seguito d'infezioni e/o infiammazioni (spesso derivanti da una riacutizzazione di fenomeni virali latenti), ma anche in condizioni di stress che si verificano frequentemente in prossimità del parto (cambio di gruppo, strutture inadeguate, mungitura ecc..) o per anomalie digestive.

Le citochine attivano la risposta infiammatoria locale stimolando la liberazione degli eicosanoidi che sarebbero responsabili di rialzi termici, anoressia, aumentato catabolismo (specie lipidico), deviazione delle sintesi proteiche a livello epatico con riduzione della sintesi di albumine, enzimi, "carriers" di vitamine ed ormoni, lipoproteine. Il TNF (Tumor Necrosis Factor), citochina secreta sia dai macrofagi che dalle cellule di Kupfer nel fegato, ha attività citotossica ed è anche capace di modificare il destino dei nutrienti (Elsasser *et al.*, 1997); questo mediatore può aumentare l'esterificazione e ridurre l'ossidazione degli acidi grassi, pertanto il rilascio di citochine potrebbe favorire un accumulo di trigliceridi nel fegato e quindi il rischio di steatosi. A ciò va aggiunto che gli adipociti sono in grado di liberare

citochine come il TNF α e la IL6 (Interleuchina 6) che favoriscono la lipolisi (Steppan e Lazar, 2002).

In prossimità del parto si osservano spesso “quadri” ematochimici tipici di situazioni infiammatorie anche in assenza di evidenti sintomi di infezioni (Cappa *et al.*, 1989; Trevisi *et al.*, 2002), ed esiste una correlazione tra i principali indici dello stato infiammatorio (innalzamento di aptoglobina, ceruloplasmina e globuline e riduzione di zinco, colesterolo e vitamina A) e le performance delle bovine. In questi casi, si osserva un calo dell’attività epatica, un ritardo del picco di lattazione, una minore ingestione degli alimenti e una perdita di peso più marcata, un ritardo nel ripristino della normale attività ciclica dell’ovaio e una riduzione dell’efficienza riproduttiva (Trevisi *et al.*, 1998).

Le citochine liberate dalle cellule del sistema immunitario e finalizzate ad una reciproca azione di coordinamento, nonché a determinare i processi infiammatori e metabolici utili a contrastare i patogeni, hanno in sé un paradosso: sono i principali mediatori dei processi patologici che accompagnano le infezioni (Riollet *et al.*, 2000).

Fra le queste conseguenze negative che le citochine svolgono troviamo:

- a) La riduzione di appetito, soprattutto in prossimità del parto (prima e dopo).
- b) La predisposizione a fenomeni di lipidosi epatica, legati da un lato, al maggior rilascio e

dall’altro alla minore ossidazione dei NEFA, di qui accresciuta disponibilità per il processo

di esterificazione con sovrabbondanza di TG; fondamentale è tuttavia la minor produzione

di apolipoproteine, e quindi di VLDL, l’unico mezzo per sottrarre al fegato i TG formati. Il conseguente accumulo dei TG (lipidosi o steatosi) ha poi varie conseguenze negative, fra cui la minor produzione di urea con accumulo di ammoniaca e minor formazione di glucosio dagli aminoacidi, per cui si complica il metabolismo lipidico e si accresce la lipolisi (circolo vizioso).

- c) La compromissione dell’attività riproduttiva sia quale conseguenza dei predetti fenomeni

(aggravamento dello squilibrio energetico-proteico) e sia per un effetto diretto delle citochine (e/o eicosanoidi) nel determinare luteolisi, variazioni “erratiche” di progesterone

ed LH, ecc. (Bertoni, 2003).

3. OBIETTIVO DELLA RICERCA

Lo sviluppo di un protocollo diagnostico integrato per il controllo della salute e del benessere della vacca da latte ad alta produzione potrà basarsi sulle eventuali correlazioni esistenti tra diversi parametri ematobiochimici ed immunologici, testati durante il periodo di transizione, e lo sviluppo di una o più disfunzioni metaboliche e cliniche durante la fase di lattazione. Di fatto, gli episodi di malattia condizionata sono spesso preceduti, in una fase pre-clinica, da alterazioni flogistiche e immunitarie obiettivabili a livello dell'esame emocromocitometrico, del profilo biochimico-metabolico, dell'elettroferogramma e dell'analisi di sottopopolazioni cellulari coinvolte nelle reazioni di difesa dell'organismo. Pertanto accertare le correlazioni esistenti tra le alterazioni dell'equilibrio omeostatico delle bovine e l'insorgenza di patologie condizionate durante il periodo di transizione significa accertare la capacità predittiva di tali indicatori ematici nei confronti delle diverse disfunzioni metaboliche della vacca da latte e, conseguentemente, essere in grado, da una parte di intervenire in maniera adeguata e puntuale sugli animali sofferenti al fine di incrementare il loro livello di benessere e, dall'altro, poter fornire indicazioni utili agli allevatori al fine di ridurre i trattamenti farmacologici sugli animali e i casi di rimozione precoce delle bovine dal processo produttivo, con le relative ingenti perdite economiche.

La presente sperimentazione rientra all'interno di un progetto di ricerca finalizzato allo studio dell'adattamento degli animali agli ambienti di allevamento (RF IZSLER 2006 201). Tale studio si pone come obiettivo quello di confrontare i risultati di laboratorio con la storia clinica e produttiva degli animali individuando i parametri maggiormente in grado di descrivere l'entità dello sforzo di adeguamento omeostatico della bovina al sistema produttivo particolarmente spinto della vacca da latte ad alta produzione e se, e con quale attendibilità esistano dei parametri ematici che permettano di predire lo sviluppo di disfunzioni metaboliche e cliniche negli animali durante la fase di transizione.

La presente tesi si pone come obiettivo quello di individuare come le principali sottopopolazioni linfocitarie ($CD4^+$, $CD8^+$ e $WC1^+$) variano durante il periodo di transizione in funzione della produzione e del numero di cellule somatiche nel latte, dell'effetto azienda e del confronto tra pluripare e primipare, e se questi parametri possono essere considerati indici attendibili per descrivere lo stato sanitario della vacca in transizione.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Descrizione aziendale e scelta del campione

La sperimentazione si è svolta presso due aziende zootecniche situate nella provincia di Vicenza (VI), scelte nell'ambito di una Ricerca (RF IZSLER 2006 201) finalizzata allo studio dell'adattamento degli animali agli ambienti di allevamento. Il progetto vede coinvolte numerose Unità Operative facenti parte del sistema Sanitario Nazionale, tra le quali l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie con il quale l'Università degli Studi di Padova collabora.

Entrambe le aziende allevano vacche da latte ad alta produzione (prevalentemente di razza Frisona e Bruna).

Alcune tra le principali caratteristiche aziendali sono riportate in tabella 2.

Tabella 2. *Descrizione delle caratteristiche dell'Azienda oggetto dell'esperimento.*

		Az. A	Az. B	
Consistenza della mandria	N° totale vacche	219	293	
	N° vacche in lattazione	190	260	
	N° totale manze	196	210	
Destinazione del latte		Latte alimentare	Caseificio del Consorzio Grana Padano	
Caratteristiche delle strutture di ricovero	Stabulazione durante il periodo sperimentale	Box ampi con paglia	Cucette	
Dati produttivi	Quantitativi	Produzione media (Kg)	34,8	31,7
	Qualitativi	Grasso (%)	3,58	3,64
		Proteina (%)	3,23	3,31
		N° medio cell somatiche (ml)	121(aritmetica)/120 (poderata)	285(arit)/214(p ond)
Dati riproduttivi	N° inseminazioni per concepimento	2,4	3,2	
	Giorni parto prima fecondazione	52	57	
	Intervallo parto-concepimento	111	133	
	N° lattazioni medie	2,5	2,5	
	Età al parto	3,8	3,9	

Durante la sperimentazione le bovine sono state alimentate con unifeed (piatto unico) (per la composizione delle razioni vedi allegato 1). All'inizio dell'esperimento, nel mese precedente il parto, le bovine di entrambe le aziende erano alimentate con una dieta tipica da asciutta. Successivamente, gli animali hanno ricevuto una razione formulata per garantire i fabbisogni di lattazione. (inserire una tabella con le caratteristiche salienti dell'unifeed)

Gli animali sottoposti a sperimentazione sono stati 13 in totale, rispettivamente 6 provenienti dall'azienda A (di cui 2 primipare e 4 pluripare) e 7 dall'azienda B di cui (1 primipara e 6 pluripare). Gli animali, scelti in base alla presunta data del parto, sono stati monitorati durante i 30 giorni precedenti e seguenti il parto. I principali dati produttivi e sanitari degli animali riscontrati durante la sperimentazione sono riportati in tabella 3 e 4.

Tabella 3. *Dati produttivi relativi alle 10 bovine oggetto di studio*

	Az. A (n = 4)	Az. B (n = 6)
Produzione media (Kg/capo)	35,5	33,16
% grasso	3,7	3,5
% proteina	3,2	3,2
n° medio di cellule somatiche	113 ±26,22	192 ±25,23

n = numero delle bovine pluripare oggetto di studio

Tabella 4. *Dati sanitari relativi agli animali sperimentali*

	Az. A (n = 6)	Az. B (n = 7)
Patologie riscontrate nel post-partum	Ipocalcemia, mastite e flebite riscontrati in un solo animale (poi riformato)	Problemi respiratori in due animali su 7 (poi riformati), endometriti di diverso stadio in 3 animali su 7, problemi podali in un animale su 7

n = numero totale delle bovine oggetto di studio

4.2 Disegno sperimentale

Il periodo di sperimentazione ha avuto inizio in entrambe le aziende nel mese di ottobre e si è concluso nel mese di dicembre 2008.

Dalle bovine sono stati prelevate tre diverse aliquote di sangue necessarie alla determinazione dei parametri ematici oggetto di studio. I prelievi sono stati eseguiti a 15/10 e 5/1 giorni prima del parto, e a 1/5, 10/15 e 30/35 dopo il parto.

4.2.1 Esecuzione dei prelievi

I prelievi di sangue sono stati effettuati dalla vena giugulare degli animali appena catturati, nell'intervallo di tempo trascorso tra la prima mungitura e il passaggio del carro unifed. Il sangue è stato prelevato in 3 provette di tipo *Vacutainer* (Becton, Dickinson, Meylan, Cedex, Francia), due contenenti anticoagulante (rispettivamente Li-eparina per le analisi di citofluorimetrica e K3EDTA per l'esame emocromocitometrico), e la terza senza

anticoagulante. Ogni campione raccolto è stato opportunamente identificato in stalla con il numero di matricola dell'animale e trasportato in un contenitore coibentato al Laboratorio di Clinica Medica dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie di Legnaro (PD) per la determinazione dei parametri ematologici riportati in tabella 5.

Tabella 5. *Analisi ematologiche e relativi parametri oggetto di studio*

ANALISI EFFETUATE	PARAMETRI MISURATI
Elettroforesi Sieroproteica	PT, Alb (totali e %), Alfa1 (totali e %), Alfa2 (totali e %), Beta1 (totali e %), Beta2 (totali e %), Gamma (totali e %)
Esame emocromocitometrico	WBC (leucociti totali), Neu (neutrofili totali e %), Lym (linfociti totali e %), Mono (monociti totali e %), Eos (eosinofili totali e %), Baso (basofili totali e %)
Citofluorimetria a flusso	Linfociti CD4, CD8, WC1

Una volta giunti in laboratorio, i campioni di sangue intero prelevati con anticoagulante sono stati subito analizzati, mentre i campioni prelevati senza anticoagulante sono stati sottoposti a centrifugazione per 10 min a +20°C a 4000 giri, previo distacco del coagulo. Il siero ottenuto dalla centrifugazione è stato poi aliquotato in 2 provette di plastica da 2,5 ml utilizzando le apposite pipette monouso (transfer pipette, SARSTED Germania). Successivamente, le aliquote sono state etichettate indicando il numero identificativo del campione e la data del prelievo. I campioni sono stati poi congelati e conservati a -20° C fino al momento dell'analisi.

4.2.2 Analisi di laboratorio

Elettroforesi delle siero proteine

Lo scopo della elettroforesi è quello di uno studio analitico delle proteine sieriche, realizzabile sfruttando la proprietà che le stesse hanno di migrare e separarsi se sottoposte a campi elettrici. Il gel di agarosio tamponato a pH alcalino viene utilizzato come mezzo attraverso il quale “corrono” le proteine, differenziandosi così in base alla loro carica elettrica netta e al loro pH. Le sieroproteine sottoposte a campi elettrici si separano in 6 frazioni principali: albumina, alfa-1 globuline, alfa-2 globuline, beta-1 globuline, beta-2 globuline e gamma globuline. In seguito alla migrazione elettrofrenica i gel vengono essiccati e successivamente

colorati con Amidoschwarz permettendo quindi la lettura delle diverse frazioni sieroproteiche. Tale lettura viene effettuata grazie all'utilizzo di software dedicato che permette di convertire la densità delle diverse bande proteiche in un protidogramma in cui ciascun picco coincide con una specifica frazione proteica.

L'elettroforesi, nella sua applicazione su supporto solido, è la tecnica di primo approccio per lo studio delle alterazioni quali-quantitative delle principali proteine sieriche. Le alterazioni quantitative della composizione proteica del siero consistono nell'aumento o nella diminuzione di una o più frazioni proteiche, più di rado nella comparsa di proteine abnormi. La possibilità di dividere le varie classi proteiche è utile al fine dell'interpretazione clinica di determinate patologie conclamate nonché della valutazione di aspetti fisiologici correlati allo stato di benessere degli animali.

Esecuzione dell'analisi

Campione: siero

Principio del metodo: gel di agarosio da colorare con Amidoschwarz.

Sistema analitico: analizzatore biochimico per elettroforesi Sebia Hydrasis LC, kit HYDRAGEL PROTEIN(E) 15/30

Esame emocromocitometrico

L'esame emocromocitometrico completo è stato eseguito con lo strumento CELL-DYN, 3500® , in grado di misurare, contare e calcolare i parametri di ematologia e dotato di un software per uso veterinario. Lo strumento aspira $130 \mu\text{l} \pm 5\%$ di campione e tramite la valvola di ripartizione lo suddivide in tre aliquote che vengono poi opportunamente diluite per la lettura. La determinazione dei parametri ematologici si basa su quattro metodi di misurazioni indipendenti:

- Citometria ottica a flusso. Tale metodologia è nota come tecnica MAPSS (Multi-Angle Polarized Scatter Separation) utile al conteggio dei leucociti totali (WOC) e alla determinazione della formula leucocitaria. In particolare, con tale metodica le cellule vengono fatte passare all'interno di un flusso e colpite con un raggio LASER; alcuni sensori posti a diversa angolazione attorno alla cellule valutano poi la loro capacità di deviare il raggio (diversa a seconda delle caratteristiche morfologiche delle

cellule). Gli angoli di dispersione del raggio laser che vengono misurati sono quattro: a 0° viene valutata la dimensione della cellula; a 10° si caratterizza la complessità della cellula; a 90° si misura la lobularità della cellula mentre a 90° si determina la granularità. L'elaborazione di questi dati porta alla classificazione di ogni cellula nelle cinque popolazioni leucocitarie note.

- Canale di impedenza elettrica per il conteggio dei leucociti totali (WIC). Le cellule leucocitarie preventivamente diluite con il reagente di lisi WIC/HGB, vengono misurate al loro passaggio attraverso un'apertura di dimensioni pari a 100 µm di diametro x 77µm di lunghezza posta tra due elettrodi. Tale passaggio produce una variazione transitoria della resistenza tra gli elettrodi traducibile in un impulso elettrico misurabile. Il numero di impulsi generati indica il numero di particelle che hanno attraversato l'orifizio. Il dato ottenuto viene confrontato con il valore WOC precedentemente descritto al fine di ottenere un valore accurato dei leucociti totali.
- Canale di impedenza elettrica per il conteggio degli eritrociti e piastrine. Questo metodo si basa sulla misurazione delle variazioni di corrente elettrica che vengono prodotte quando una particella sospesa in un liquido conduttivo passa attraverso un orifizio di dimensioni note (60 µm di diametro x 72 µm di lunghezza) posto tra due elettrodi. Tale variazione viene poi tradotta in impulso elettrico misurabile. Il numero di impulsi generati indica il numero di particelle che hanno attraversato l'orifizio, mentre l'ampiezza di ciascun impulso è proporzionale al volume della cellula che lo ha prodotto.
- Spettrofotometria per il dosaggio dell'emoglobina. Questo procedimento si basa sulla determinazione mediante reazione colorimetrica dell'emoglobina liberata per lisi degli eritrociti e resa stabile dal reagente di lisi WIC/HGB. La densità ottica del campione letta dallo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 540 nm è direttamente proporzionale alla concentrazione di emoglobina (Archetti *et al.*, 2002)

Esecuzione dell'analisi

Campione: sangue intero con anticoagulante K3EDTA

Sistema analitico: analizzatore multiparametrico automatizzato CELL-DYN, 3500®, (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL USA).

Citofluorimetria a flusso

La citofluorimetria a flusso è una tecnica diagnostica che consente uno studio approfondito delle cellule del sistema immunitario, grazie all'utilizzo di anticorpi marcati con molecole fluorescenti.

Gli anticorpi monoclonali utilizzati in questa sperimentazione sono coniugati a fluorocromi naturali, solubili in acqua, fluorescenti a pH neutro e con elevate rese quantiche, con caratteristiche tali da non alterare la capacità di legame antigene-anticorpo. Ogni fluorocromo presenta specifiche lunghezze d'onda per l'eccitazione luminosa e per l'emissione di fotoni.

Le sostanze fluorescenti più utilizzate in citofluorimetria a flusso si possono dividere in tre gruppi principali: il primo gruppo comprende fluorocromi impiegati per lo studio di funzioni intracellulari, come il pH intracellulare e il Ca intracitoplasmatico; il secondo gruppo comprende fluorocromi dotati di affinità per gli acidi nucleici (es, ioduro di propidio); il terzo gruppo comprende sostanze in grado di legarsi stabilmente a proteine. L'utilizzo più frequente di quest'ultimo gruppo consiste nella marcatura delle proteine anticorpali impiegate nelle tecniche di immunofenotipizzazione per l'evidenziazione degli antigeni di membrana: attualmente i coniugati più comunemente utilizzati sono la fluoresceina isotiocianato (FITC) e la ficoeritrina (PE) che assorbono ad una lunghezza d'onda pari a 488nm Blue.

Nelle tecniche di immunofenotipizzazione è ormai necessario eseguire determinazioni multiparametriche, ovvero evidenziare contemporaneamente più di un antigene (es. analizzare CD4 e CD8 contemporaneamente). Risulta quindi indispensabile avere a disposizione più anticorpi monoclonali coniugati con fluorocromi diversi: i fluorocromi adottati devono avere spettri di eccitazione abbastanza simili per essere eccitati dalla stessa sorgente di luce disponibile (generalmente la linea a 488nm di un laser ad argon) e spettri di emissione abbastanza diversi da essere rilevabili separatamente. FITC e PE soddisfano questi requisiti e, per caratteristiche spettrali, efficienza quantica, stabilità e facilità di coniugazione con gli anticorpi, costituiscono da tempo i fluorocromi di scelta per l'analisi a due fluorescenze con strumenti dotati di una sole fonte di luce.

Preparazione del campione

Attraverso questa metodica, i linfociti bovini vengono marcati direttamente su sangue intero e solo successivamente viene effettuata la lisi dei globuli rossi. È stato utilizzato il lisante FACS Lysing Solution che, grazie a particolari condizioni ipotoniche, lisa i globuli rossi mentre

preserva i leucociti. L'uso di questo buffer fornisce risultati riproducibili e preserva le proprietà di "light scattering" dei leucociti.

A 100 µl di sangue intero sono stati aggiunti 5 µl di anticorpo monoclonale per l'immunofenotipizzazione. Gli anticorpi utilizzati in questa prova sono anticorpi anti bovino-CD4:RPE, -WC1FITC,-CD8:FITC della ditta Serotec (AbD Serotec; Oxford UK). Inoltre, anticorpi dello stesso isotipo e con la stessa marcatura (PE e FITC), ma non in grado di riconoscere le cellule bovine, sono stati utilizzati come controlli negativi. I campioni sono stati incubati per 30 minuti a 4°C e poi addizionati con 2 ml di lisante, diluito 1:10 con acqua distillata. Successivamente, sono stati incubati per 10 minuti a temperatura ambiente al buio e infine centrifugati a 1200 giri per 10 minuti. Eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 500 µl di FACS Flow (o PBS addizionato a BSA all'1%). I campioni sono stati quindi acquisiti al Citofluorimetro e analizzati con il software Cell Quest Pro™.

Esecuzione dell'analisi

Campione: sangue intero con anticoagulante Li-eparina

Sistema analitico: analizzatore BD FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose CA USA).

4.3 ANALISI DEI DATI

Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza, mediante modello lineare generalizzato di SPSS (SPSS Inc. 2005).

Una prima analisi statistica è stata effettuata per confrontare l'effetto dell'ordine di parto (pluripare vs primipare) e del livello produttivo (<40kg/d vs >40kg/d) indipendentemente dall'azienda. Ciò perché il numero degli animali primipari era estremamente basso (N=3) e non avrebbe consentito l'applicazione di un modello statistico più complesso. I termini utilizzati nel modello sono stati: ordine di parto (OP), livello produttivo (P), prelievo (Pr), Animale (A) e OP*Pr.

Successivamente, per studiare le differenze tra i due allevamenti, si è deciso di utilizzare solamente le bovine pluripare. In questo caso, le variabili indipendenti del modello sono state le seguenti: azienda (Az), Pr, Az*Pr e A entro Az.

Qualora il termine del modello fosse risultato statisticamente significativo, la differenza tra le medie è stata studiata mediante “t-test”.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 DESCRIZIONE DEI PARAMETRI LEUCOCITARI

Durante il periodo di studio per i parametri ematici si sono riscontrate le seguenti variazioni:

Il numero dei WBC aumenta nelle due settimane antecedenti al parto e diminuisce dopo il parto. L'aumento dei WBC è dovuto principalmente a un aumento concomitante dei neutrofili e delle cellule mononucleate del sangue.

I neutrofili come i WBC aumentano prima del parto e diminuiscono dopo il parto. È stato ipotizzato che l'aumento dei neutrofili circolanti sia associato a un aumento plasmatico dei corticosteroidi al parto (Guidry *et al.*, 1976).

Il numero dei linfociti aumenta progressivamente prima del parto e diminuisce dalla seconda settimana di lattazione. I dati ottenuti in questo studio sono leggermente discrepanti rispetto a quello trovati da Kehrl *et al.*, (1989) e da Meglia *et al.*, (2005). Ciò può essere dovuto a differenze nell'intervallo di campionamento, al numero di animali oggetto di studio e al metodo usato.

A differenza dei neutrofili e dei linfociti, i monociti invece sono elevati subito prima del parto e subito dopo il parto (per i dati vedi allegato 2)

I cambiamenti del numero delle cellule principalmente coinvolte nella risposta immunitaria sono paragonabili a quanto riportato in letteratura (Meglia *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2002; Kimura *et al.*, 1999; Kehrl e Goff, 1989a, 1989b). In linea con gli altri studi, attorno al parto, si è osservata una neutropenia, linfopenia e monocitosi. Queste variazioni sono probabilmente dovute a un effetto dei glucocorticoidi e di altri ormoni rilasciati in prossimità del parto (Meglia *et al.*, 2005).

I parametri che riguardano le sieroproteine non sono stati considerati poiché non erano oggetto vero e proprio della ricerca, ma osservando i grafici si può riscontrare dopo il parto e nella prima fase della lattazione un aumento di tutte le frazioni proteiche, probabilmente perché si assiste a un fenomeno infiammatorio. Le 1 e 2 globuline comprendono infatti una vasta gamma di proteine che vanno incontro ad incremento in seguito a diverse condizioni patologiche, come ad esempio infiammazioni acute, sindromi nefrosiche o affezioni epatiche (Amadori M. *et al.*, 2002).

5.2 DESCRIZIONE DELLE SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE: CD4⁺, CD8⁺, WC1⁺

La percentuale di linfociti CD4⁺ diminuisce in prossimità del parto in entrambe le aziende anche se la differenza è molto più evidente nell'azienda A piuttosto che nell'azienda B. Subito dopo il parto invece il numero dei linfociti T-helper aumenta (figura 6).

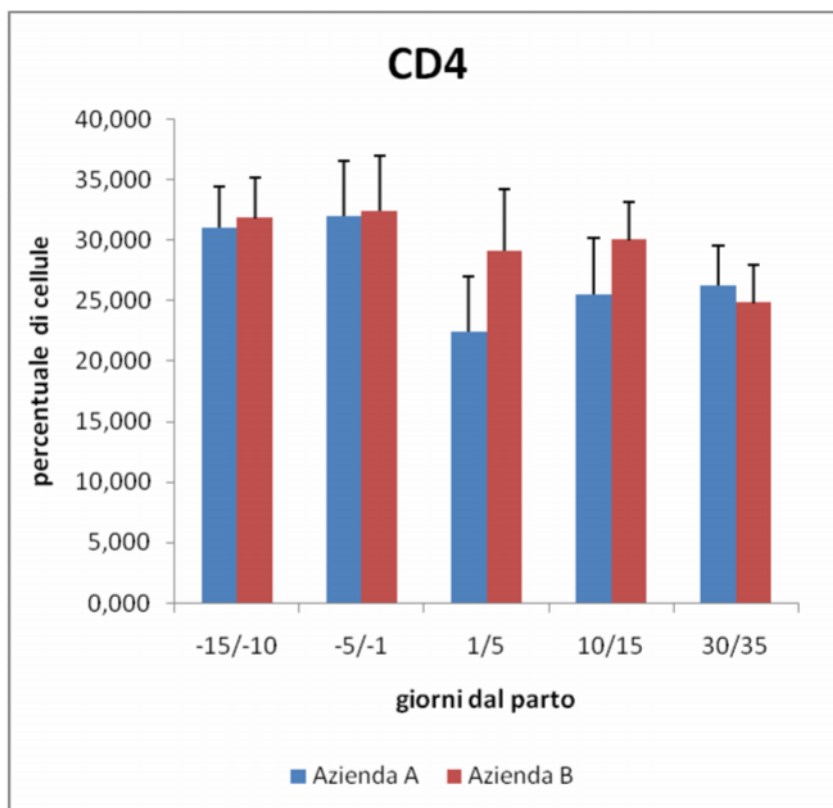


Figura 6. Andamento dei linfociti CD4⁺ nelle bovine da latte durante la fase di transizione.

Per quanto riguarda i linfociti CD8⁺, si può osservare in figura 7 un andamento simile ai CD4⁺, ovvero una diminuzione del numero di linfociti citotossici/soppressori in prossimità del parto e un aumento subito dopo il parto. La variazione dei linfociti CD4⁺ e CD8⁺ non sono risultati statisticamente significative, ma concordano con quanto osservato in altri studi (Van Kampen e Mallard, 1997; Kimura *et al.*, 1999; Harp *et al.*, 1991; Kimura *et al.*, 2002; Karcher *et al.*, 2008). Per quanto riguarda i linfociti CD8⁺ i dati riscontrati nel presente studio non sono in accordo con quanto trovato da Meglia e coll (2005), i quali hanno osservato un aumento del numero dei CD8⁺. Harp e coll. (1991) invece, non hanno osservato cambiamenti significativi nei linfociti soppressori/citotossici.

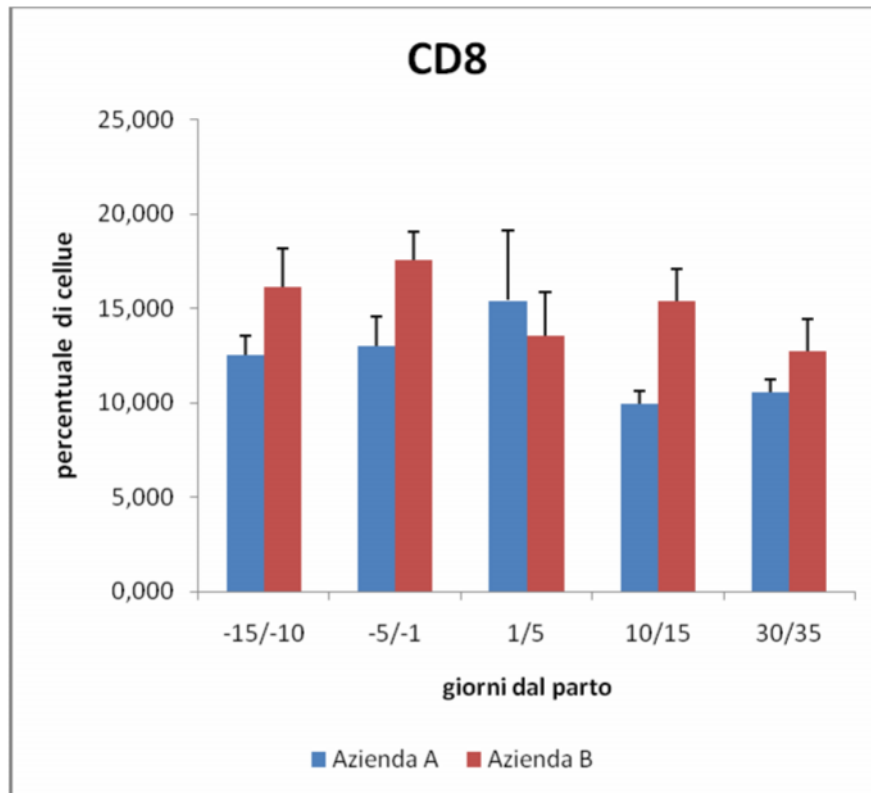


Figura 7. Andamento dei linfociti CD8⁺ durante il periodo oggetto di studio.

Le cellule T-helper giocano un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria poiché mediano sia la risposta umorale che quella cellulo-mediata. Attraverso la produzione di citochine e di interferone γ stimolano la proliferazione e l'attivazione dei CD8⁺, attivano i macrofagi e favoriscono l'attivazione e la proliferazione dei linfociti B (Stuehr e Marletta, 1987; Flynn *et al.*, 1993).

Anche i CD8⁺ svolgono un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria in particolare in quella cellulo-mediata. Mantengono infatti l'integrità dei tessuti e favoriscono la rimozione dei patogeni e delle cellule infette grazie al riconoscimento degli antigeni (Smith *et al.*, 1999; Patton *et al.*, 2004). In presenza di un patogeno l'aumento vascolare dei linfociti citotossici è immediato poiché l'interferone γ , i CD4⁺ e i CD21⁺ (Park *et al.*, 1992) promuovono la proliferazione dei CD8⁺ mantenendo un'omeostasi immunitaria (Riollet *et al.*, 2000).

Pertanto, una diminuzione dei linfociti T-helper attorno al parto si ripercuote direttamente sulla proliferazione dei linfociti CD8⁺ alterando in ultima l'omeostasi immunitaria.

La diminuzione delle popolazioni linfocitarie nel sangue può essere quindi ricondotta a uno stato di immuno-disfunzione (Wolkers *et al.*, 2004). Pertanto si presume che l'indebolimento funzionale e numerico delle sottopopolazioni linfocitarie CD4 e CD8 attorno al parto, possa essere collegato all'immunospressione osservata durante il periodo di transizione, dato che i

due eventi sono concomitanti (Kimura *et al.*, 1999). Il perché di tale diminuzione in entrambe le sottopopolazioni rimane ancora inspiegata.

Anche il rapporto CD4/CD8 è stato oggetto di studio e, osservando la figura 8, si può notare che il rapporto varia durante il periodo di campionamento entro un range di 2-2,5. Quanto esaminato non è risultato statisticamente significativo. Spesso il rapporto CD4/CD8 viene usato come indice di immunospressione. Per esempio nei pazienti umani affetti da AIDS (sindrome d'immunodeficienza acquisita) si è riscontrato una diminuzione del numero dei linfociti T e un'inversione del rapporto CD4/CD8.

Anche Karcher e coll. (2008), nel loro studio hanno evidenziato una sensibile diminuzione del rapporto CD4/CD8 nei soggetti infetti clinicamente con *Mycobacterium avium paratuberculosis* rispetto a quelli subclinici.

Questo potrebbe far supporre che il rapporto CD4/CD8 possa essere considerato un indice dell'immunospressione riscontrata nel periparto. Si presume infatti che l'indebolimento delle funzioni delle cellule immunitarie sia associato con una diminuzione delle sottopopolazioni di linfociti T, poiché questi due eventi accadono nello stesso intervallo di tempo (Kimura *et al.*, 1999).

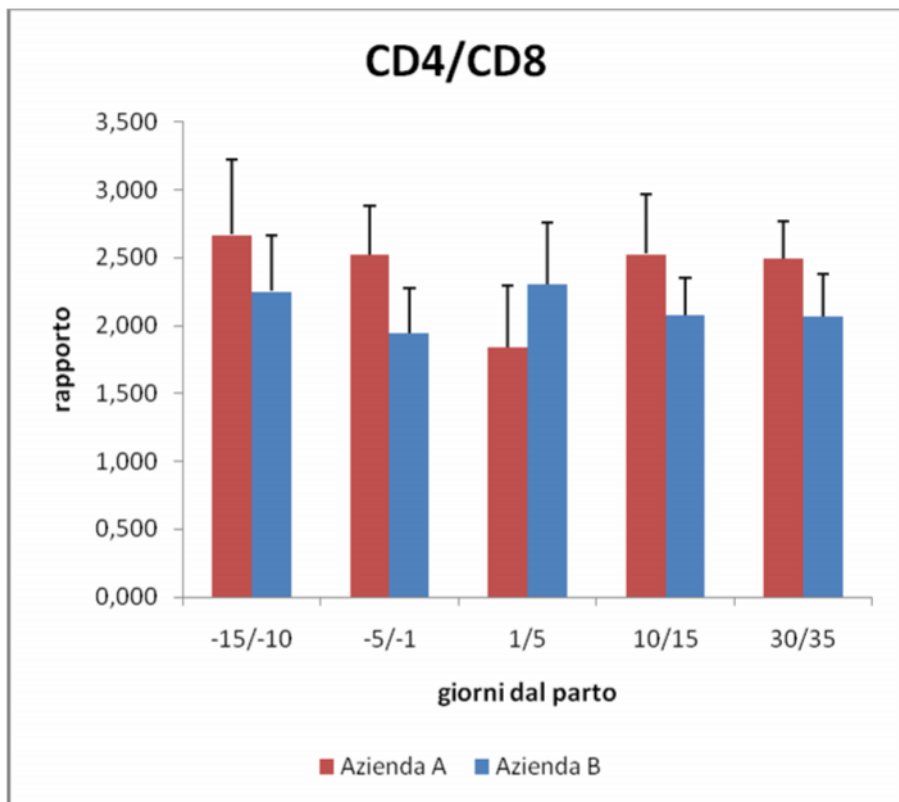


Figura 8. Andamento del rapporto CD4/CD8 durante il periodo oggetto di studio

I linfociti WC1 diminuiscono in prossimità del parto, rimanendo pressoché stabili nella seconda settimana di lattazione. Questo si è osservato in entrambe le aziende. Si è visto che i WC1 hanno un effetto protettivo sui tessuti epiteliali indotti in risposta a una stimolazione delle cellule Th1 (Baldwin *et al.*, 2000; Pollock e Welsh, 2002). Una diminuzione di queste cellule potrebbe per tanto indicare una minor effettiva difesa contro gli agenti infettivi.

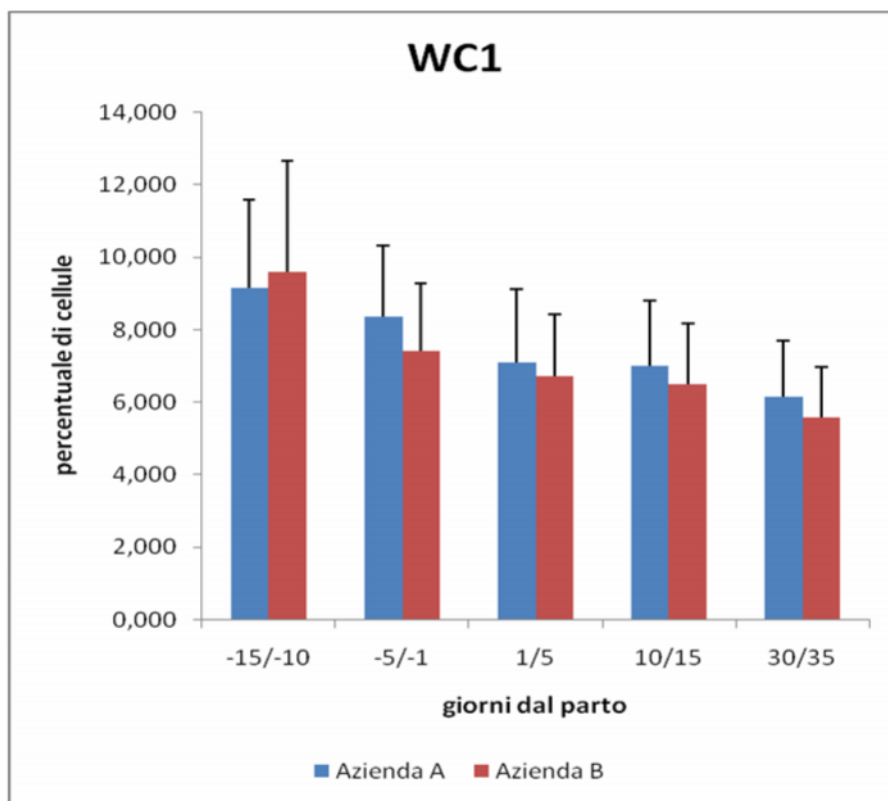


Figura 9. Andamento dei linfociti WC1 durante il periodo di transizione.

5.3 CONFRONTO DEI PARAMETRI EMATICI TRA PRIMIPARE E PLURIPARE

Un primo confronto è stato effettuato tra le primipare e le pluripare di entrambe le aziende. Non è stato possibile effettuare tale confronto tra le due aziende poiché il numero delle primipare risultava essere troppo basso (2 primipare nell'azienda A e 1 nell'azienda B).

La differenza del numero di linfociti ($P < 0,001$), della percentuale di $CD4^+$ ($P < 0,05$) e di WC1 ($P < 0,001$) sono risultati essere statisticamente significativo (vedi tabella 6). Si è riscontrata una maggior concentrazione di linfociti e una maggior percentuale di WC1 nelle primipare rispetto alle pluripare, mentre per i $CD4^+$ l'andamento è risultato opposto.

L'aumento dei linfociti ($P < 0,001$) e dei WC1 ($P < 0,001$) nelle primipare rispetto alle pluripare, potrebbe essere ricondotto al fatto che le pluripare sono molto più vulnerabili alle infezioni e

la loro risposta immunitaria nei confronti dei patogeni risulta essere più lenta e più debole rispetto a quella delle primipare (Mehrzaad *et al.*, 2002; Burvenich *et al.*, 2003). La ragione di questa immunospressione nelle pluripare rispetto alle primipare non è ancora del tutto conosciuta.

Nel presente studio, sul totale degli animali, (n=13) 6 hanno riscontrato patologie nel post partum (1 nell'azienda A e 5 nell'azienda B) di questi 6 tutti sono pluripare. Questo a conferma del fatto che come affermato da Mehrzaad e Zhao, (2008) lo stato sanitario delle bovine pluripare è più deficitario di quello delle primipare e proprio per questo sono più esposte a eventuali patologie.

La percentuale dei CD4⁺ invece risulta essere più elevata nelle pluripare che nelle primipare. Confrontando le rispettive percentuali con il numero di linfociti totali si può osservare che il valore più elevato della percentuale di CD4⁺ nelle pluripare è associato in realtà ad una diminuzione dei linfociti circolanti: calcolando infatti i valori assoluti delle sottopopolazioni CD4 e CD8 si è osservato che la loro concentrazione risulta essere molto simile a quella delle primipare e il rapporto CD4/CD8 non varia in maniera significativa. La diminuzione significativa dei linfociti totali risulta essere quindi a carico di altre sottopopolazioni linfocitarie, tra cui quella dei WC1.

Tabella 6. Medie dei parametri ematici con relativa significatività statistica (P), confronto tra primipare e pluripare di entrambe le aziende.

PARAMETRI EMATICI	PRIMIPARE	PLURIPARE	VALORI di P
WBC K/ μ l	7,98 \pm 0,43	7,12 \pm 0,31	NS
Neutrofili K/ μ l	4,35 \pm 0,38	4,21 \pm 0,26	NS
Linfociti K/ μ l	2,61 \pm 0,84	1,85 \pm 0,08	0,000***
Monociti K/ μ l	0,92 \pm 0,08	0,93 \pm 0,07	NS
Neu/Linf	1,69 \pm 0,16	2,48 \pm 0,18	0,086#
CD4 %	22,20 \pm 1,64	30,53 \pm 1,45	0,033*
CD8 %	11,44 \pm 0,79	14,48 \pm 0,75	NS
CD4/CD8	1,96 \pm 0,12	2,35 \pm 1,15	NS
WC1 %	13,78 \pm 0,69	5,41 \pm 0,51	0,000***
Proteine Totali g/L	68,87 \pm 1,73	76,34 \pm 0,94	0000***
Albumine g/L	32,14 \pm 0,59	31,86 \pm 0,42	NS
Alfa 1 g/L	4,17 \pm 0,26	3,72 \pm 0,08	0,017*
Alfa 2 g/L	8,57 \pm 0,25	8,46 \pm 0,15	NS
Beta 1 g/L	6,47 \pm 0,25	6,51 \pm 0,13	NS
Beta 2 g/L	4,49 \pm 0,30	4,86 \pm 0,15	NS
Gamma g/L	12,99 \pm 1,05	20,96 \pm 0,63	0,000***

Significatività: P<0,1= #; P<0,05 = *; P<0,01 = **; P<0,001 = ***; NS = non significativo

5.4 CONFRONTO DEI PARAMETRI EMATICI SULLA PRODUZIONE

Per quanto riguarda la produttività si è osservato, per linfociti (P<0,05) per i CD4 (P<0,05) e per i CD8 (P<0,001), una differenza significativa tra le bovine che producono più di 40kg/d e quelle che producono meno di 40kg/d (vedi tabella 7). Rispettivamente per le bovine più produttive sono stati riscontrati valori più alti per quanto riguarda i CD4⁺ e i CD8⁺ e valori più bassi per i linfociti rispetto alle bovine meno produttive.

L'aumento significativo, nelle bovine più produttive, dei linfociti T-helper e dei citotossici potrebbe essere dovuto al fatto che una produzione più elevata porti la bovina a uno stato di stress maggiore (Aguggini *et al.*, 1998) che può essere simile a uno stato infiammatorio classico (Amadori M. *et al.*, 2002) e questo spiegherebbe una percentuale più alta di CD4⁺ CD8⁺.

L'aumento significativo dei linfociti T-helper e T-citotossici nelle bovine che producono di più rispetto a quelle che producono di meno è associato a una diminuzione dei linfociti circolanti. Calcolando i valori assoluti infatti si è osservato che, anche se non statisticamente significativa, il rapporto tra CD4/CD8 risulta essere molto simile tra le bovine più produttive e quelle meno produttive. La diminuzione significativa dei linfociti totali risulta essere quindi a carico di altre sottopopolazioni linfocitarie, tra cui quella dei WC1.

Il minor numero di linfociti circolanti presente nelle bovine più produttive rispetto a quelle meno produttive può essere dovuto al fatto che le, come sopraccitato, le vacche più produttive sono soggette a un maggiore stress. Lo stato di stress va ad influire direttamente sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene aumentando la produzione e quindi la concentrazione di glucocorticoidi che hanno un effetto depressivo sul sistema immunitario (Aguggini *et al.*, 1998)

Il diminuzione dei linfociti circolanti potrebbe anche essere dovuto all'aumento del numero di leucociti presenti nella mammella all'inizio della lattazione. Si suppone infatti che una quota di linfociti circolanti sia sequestrata dalla mammella, l'incremento del flusso sanguigno e della migrazione dei leucociti aumenta in prossimità del parto poiché la ghiandola mammaria si sta preparando all'inizio della secrezione latte (Gorewit *et al.*, 1989; Metcalf *et al.*, 1992). Secondo Kimura e coll i cambiamenti delle cellule mononucleate del sangue rifletterebbero i cambiamenti metabolici indotti dall'inizio della lattazione e non dal parto.

Tabella 7. *Medie dei parametri ematici con relativa significatività statistica (P), confronto tra vacche che producono più di 40 kg/d e vacche che producono meno di 40 kg/d in entrambe le aziende.*

PARAMETRI EMATICI	PRODUZIONE < 40kg/d	PRODUZIONE > 40kg/d	VALORI di P
WBC K/ μ l	7,58 \pm 0,30	6,90 \pm 0,47	NS
Neutrofili K/ μ l	4,30 \pm 0,24	4,14 \pm 0,41	NS
Linfociti K/ μ l	2,23 \pm 0,09	1,69 \pm 0,09	0,012*
Monociti K/ μ l	0,90 \pm 0,04	0,98 \pm 0,13	NS
Neu/Linf	2,03 \pm 0,14	2,73 \pm 0,31	0,66#
CD4 %	25,83 \pm 1,39	33,06 \pm 2,12	0,032*
CD8 %	11,96 \pm 0,52	16,70 \pm 1,20	0,000***
CD4/CD8	2,23 \pm 0,13	2,30 \pm 0,23	NS
WC1 %	8,90 \pm 0,82	4,84 \pm 0,64	NS
Proteine Totali g/L	72,68 \pm 1,26	77,72 \pm 1,01	0,042*
Albumine g/L	31,91 \pm 0,44	31,94 \pm 0,58	NS
Alfa 1 g/L	3,90 \pm 0,13	3,71 \pm 0,10	NS
Alfa 2 g/L	8,38 \pm 0,17	8,64 \pm 0,21	0,056#
Beta 1 g/L	6,28 \pm 0,13	6,87 \pm 0,20	0,001***
Beta 2 g/L	4,64 \pm 0,16	4,98 \pm 0,23	NS
Gamma g/L	17,57 \pm 0,94	21,60 \pm 0,70	0,000***

Significatività: P<0,1= #; P<0,05 = *; P<0,01 = **; P<0,001 = ***; NS = non significativo

5.5 CONFRONTO AZIENDALE DEI PARAMETRI EMATICI

Una seconda analisi è stata effettuata per confrontare le due aziende; a tal fine sono stati confrontati le variazioni dei parametri ematici entro le due aziende.

Confrontando le due aziende è emersa una differenza significativa per quanto riguarda il numero dei WBC (P<0,05), dei neutrofili (P<0,01), dei monociti (P<0,001), del rapporto neutrofili/linfociti (P<0,001) e dei CD8 (P<0,05) (vedi tabella 8).

Comparando le due aziende dal punto di vista igienico sanitario si è visto che l'azienda A è migliore rispetto all'azienda B. Questo è stato dedotto dall'analisi di alcuni parametri. L'analisi delle cellule somatiche nel latte è un indice non solo della qualità del latte ma anche dello stato sanitario dell'animale. Qualora infatti il numero delle cellule somatiche superi la

soglia di 200.000 cellule/mL significa che è in atto un processo infiammatorio a carico della mammella (Zecconi, 2007). L'indice delle cellule somatiche è in grado inoltre di indicare non solo la qualità del latte ma anche il management generale dell'azienda. In uno studio di Barkema e coll. (1998) è stato dimostrato che differenti management aziendali influivano sulla conta delle cellule somatiche (SCC). Rispettivamente gli allevamenti con migliore conduzione aziendale hanno riscontrato un numero di SCC inferiore a 150.000/mL mentre quelli con peggior management aziendale una conta di SCC tra le 250.000/mL e le 400.000/mL (Vedi studio Barkema *et al.*, 1998).

Anche l'incidenza delle patologie può essere considerato un buon indice di livello sanitario aziendale poiché questa sarà minore in quelle aziende dove il management e la pulizia sono più accurati.

Nell'azienda B è stato riscontrato un numero di cellule somatiche nettamente maggiore rispetto all'azienda A (214 vs 120), anche l'incidenza di patologie riscontrate nel post partum era nettamente maggiore nell'azienda B rispetto all'azienda A. Nell'azienda A una sola bovina su 6 ha manifestato ipocalcemia, flebiti e mastiti, mentre nell'azienda B 5 animali su 7 hanno riportato nel post partum endometrite di diverso stadio, mastite, problemi respiratori e podali.

Tabella 9. Descrizione dell'età e delle principali patologie riscontrate negli animali di entrambe le aziende nel post partum.

AZIENDA	ETÁ	PATOLOGIE RISCONTRATE NEL POST PARTUM
Az. A	7	I, F, M (fine carriera)
	5	
	8	
	3	
	4	
	3	
Az. B	5	R (venduta) *
	7	E +++ *
	4	R (venduta)
	4	
	6	
	7	P, M, E ++
	3	E++ *

LEGENDA

M = mastite

E = endometrite

I = ipocalcemia

F = flebite

P = problemi podali

R = problemi respiratori

*= animale trattato farmacologicamente

+ = gravità della patologia

La diminuzione del numero di linfociti circolanti e del rapporto Neutrofili/Linfociti nell'azienda B rispetto all'azienda A potrebbe essere interpretato come indice di immunosoppressione visto che come sopraccitato l'azienda B risulta essere più deficitaria dal punto di vista igienico sanitario rispetto all'azienda A.

L'aumento significativo dei CD8⁺, nell'azienda B rispetto all'azienda A, potrebbe essere dovuto a un maggior stato infiammatorio nella prima azienda rispetto alla seconda. Infatti l'azienda B presenta una maggior incidenza di patologie rispetto all'azienda A.

L'aumento del numero dei monociti nell'azienda B rispetto a quella A potrebbe essere dovuto a una maggior stimolazione del sistema immunitario per far fronte alle infezioni.

Tabella 8. *Medie dei parametri ematici con relativa significatività statistica (P), confronto tra le due aziende.*

PARAMETRI EMATICI	AZ. A	AZ. B	VALORI di P
WBC K/ μ l	7,97 \pm 0,53	6,54 \pm 0,34	0,020*
Neutrofili K/ μ l	4,89 \pm 0,44	3,75 \pm 0,29	0,002**
Linfociti K/ μ l	1,97 \pm 0,11	1,77 \pm 0,11	NS
Monociti K/ μ l	0,92 \pm 0,13	0,93 \pm 0,08	0,000***
Neu/Linf	2,64 \pm 0,30	2,37 \pm 0,23	0,001***
CD4 %	29,77 \pm 2,52	31,04 \pm 1,77	NS
CD8 %	12,75 \pm 1,27	15,63 \pm 0,89	0,042*
CD4/CD8	2,60 \pm 0,26	2,18 \pm 0,17	NS
WC1 %	4,82 \pm 0,59	5,80 \pm 0,75	NS
Proteine Totali g/L	74,40 \pm 1,33	77,63 \pm 1,27	0,000***
Albumine g/L	32,98 \pm 0,50	31,11 \pm 0,58	0,016*
Alfa 1 g/L	3,70 \pm 0,12	3,74 \pm 0,11	0,001***
Alfa 2 g/L	8,32 \pm 0,25	8,55 \pm 0,20	0,000***
Beta 1 g/L	6,43 \pm 0,20	6,57 \pm 0,18	0,071#
Beta 2 g/L	4,70 \pm 0,23	4,97 \pm 0,20	0,004**
Gamma g/L	18,30 \pm 0,72	22,73 \pm 0,78	0,000***

Significatività: P<0,1= #; P<0,05 = *; P<0,01 = **; P<0,001 = ***; NS = non significativo

6. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha permesso di concludere quanto segue.

I dati trovati riguardo i parametri leucocitari coincidono sostanzialmente con quanto trovato in letteratura. Si è riscontrato quindi una diminuzione delle sottopopolazioni linfocitarie in prossimità del parto che potrebbe essere correlata all'immunodeficienza riscontrata durante il periodo di transizione. Come osservato in altri studi si è visto che la diminuzione dei $CD4^+$ nel post partum e il rapporto $CD4/CD8$ potrebbe essere utilizzato come parametro indicativo di una deficienza a carico del sistema immunitario.

Per quanto riguarda il confronto tra aziende possiamo affermare che sia la produzione che l'effetto azienda, dovuto principalmente al management e al livello igienico sanitario modificano significativamente il numero dei linfociti circolanti. Anche il numero di parti influisce significativamente sui linfociti diminuendone il numero e, di conseguenza, influisce in maniera significativa sulla distribuzione in percentuale delle sottopopolazioni linfocitarie.

Le variazioni significative osservate durante il periodo oggetto di studio, sono state di entità moderata. I valori riscontrati inoltre rientravano tutti nell'intervallo fisiologico.

In conclusione, alla luce di quanto osservato, possiamo affermare che i parametri considerati durante la sperimentazione, sono indicativi dello stato immunitario degli animali. Risulta difficile, basandosi solo sulle sottopopolazioni linfocitarie, definire correttamente e con certezza lo stato immunitario di un animale; tanto più se tali osservazioni vengono effettuate durante il periodo di transizione che, come già detto, risulta essere problematico per la bovina da latte.

In futuro potrebbero essere eseguiti ulteriori studi per verificare se l'andamento delle sottopopolazioni linfocitarie e il loro rapporto può essere un indice indicativo di un possibile stato subclinico. A tale scopo sarebbe opportuno seguire lo studio su un elevato numero di animali monitorando se l'andamento dei $CD4^+$ dei $CD8^+$ e del loro rapporto varia significativamente tra gli animali subclinici e quelli sani. I prelievi ematici andrebbero eseguiti dopo le due settimane di lattazione poiché nelle due settimane successive al parto si

verifica uno stato infiammatorio fisiologico dovuto al parto e alla riparazione dei tessuti uterini.

ALLEGATO 1

Tablelle sulla composizione delle razioni

Stalla A

Tab. A.1.1 Razione alimentare in lattazione stalla A, periodo novembre dicembre 2008

ALIMENTO	QUANTITÀ Kg
Semi di lino	0,25
Farina di mais	2,70
Bicarbonato di sodio	0,10
G 300	0,35
Grassi	0,35
Girasole	1,10
Distiller mais	0,70
Soia proteica	2,40
Crusca	0,70
Fieno di medica	4,00
Silo di loietto	5,00
Pastone di mais	6,00
Silomais	20,00

Stalla B

Tab. B.1.1 Mangime per vacche in lattazione stalla B

COMPOSIZIONE	TENORI ANALITICI SUL T.Q.
	%
Farina di estrazione di soia	19,00
Semi di lino	3,50
Glutine di granoturco	6,50
Fosfato bicalcico	32,00
Carbonato di calcio	
Melasso di canna da zucchero	
Cloruro di sodio	

Tabella sull'analisi degli alimenti

Stalla A

Tab. A.1.2 Cartellino NIRS insilati stalla A, periodo novembre.

PARAMETRI	VALORE	UNITÀ DI MISURA
Umidità	34,87	% p/p
Sostanza Secca	85,13	% p/p
Proteina	16,57	% p/p*6,25 gg
Lipidi	1,88	% p/p su ss
Amido	22,52	% p/p su ss
NDF	43,84	% p/p su ss
Estrattivi inazotati	52,98	% p/p su ss
Fibra grezza	19,88	% p/p su ss
Ceneri	8,59	% p/p su ss

Stalla B

Tab. B.1.2 Cartellino NIRS unifeed stalla B, periodo ottobre 2008.

PARAMETRI	VALORE	UNITÀ DI MISURA
Umidità	43,70	% p/p
Sostanza Secca	56,30	% p/p
Proteina	16,89	% p/p*6,25 gg
Lipidi	4,01	% p/p su ss
Amido	19,98	% p/p su ss
NDF	50,50	% p/p su ss

ALLEGATO 2

Grafici dei parametri misurati, media delle due aziende

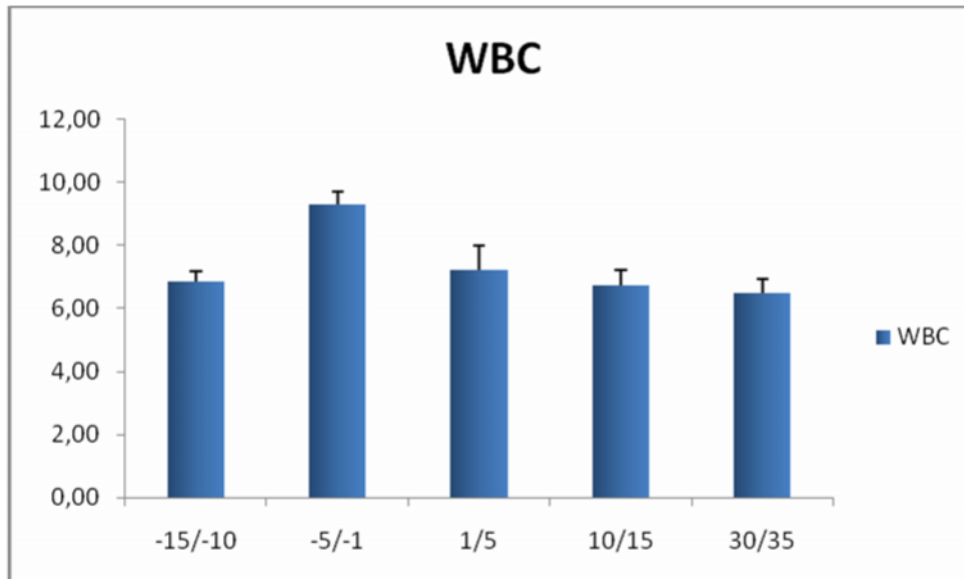


Fig. C.1 Andamento dei WBC durante il periodo oggetto di studio

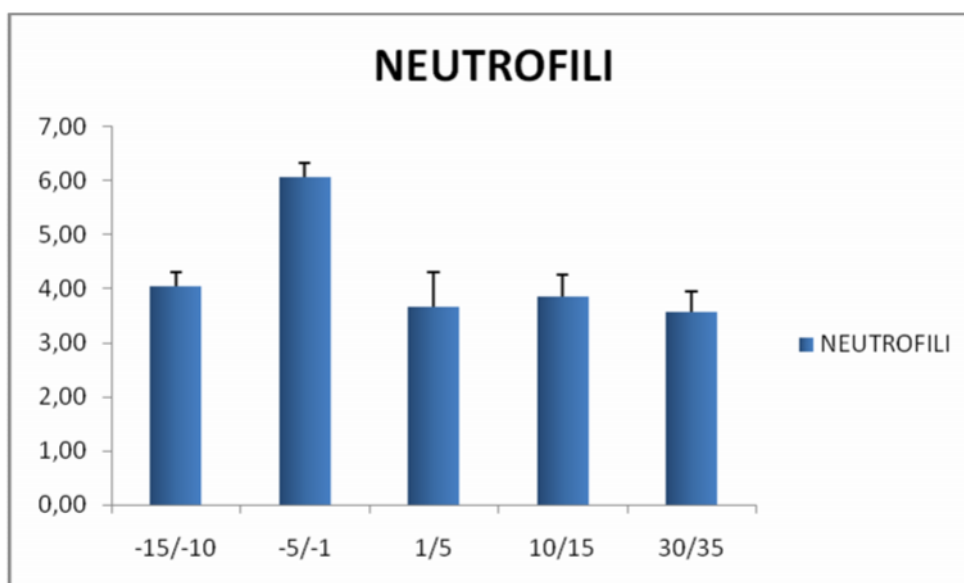


Fig. C.2 Andamento dei neutrofili durante il periodo oggetto di studio

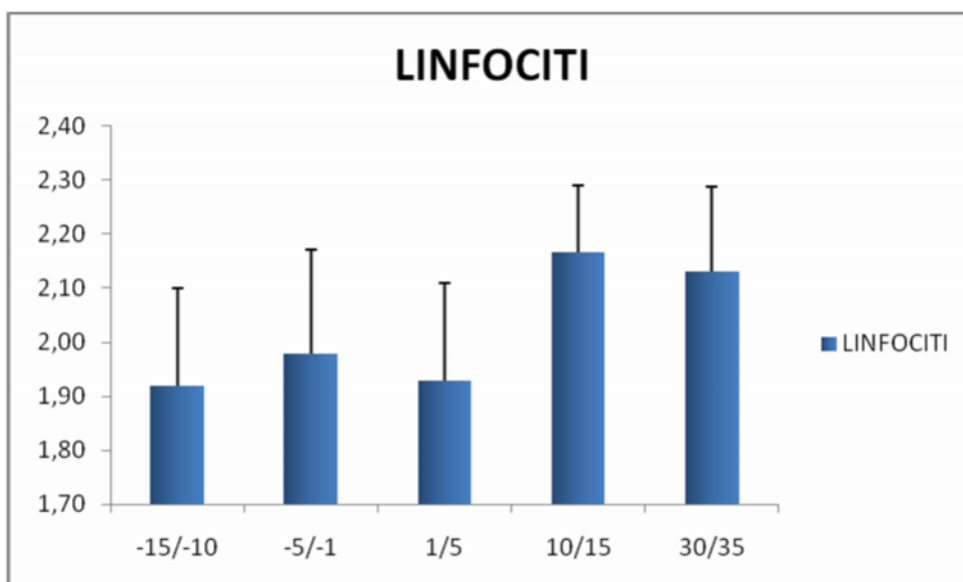


Fig. C.3 Andamento dei linfociti durante il periodo oggetto di studio

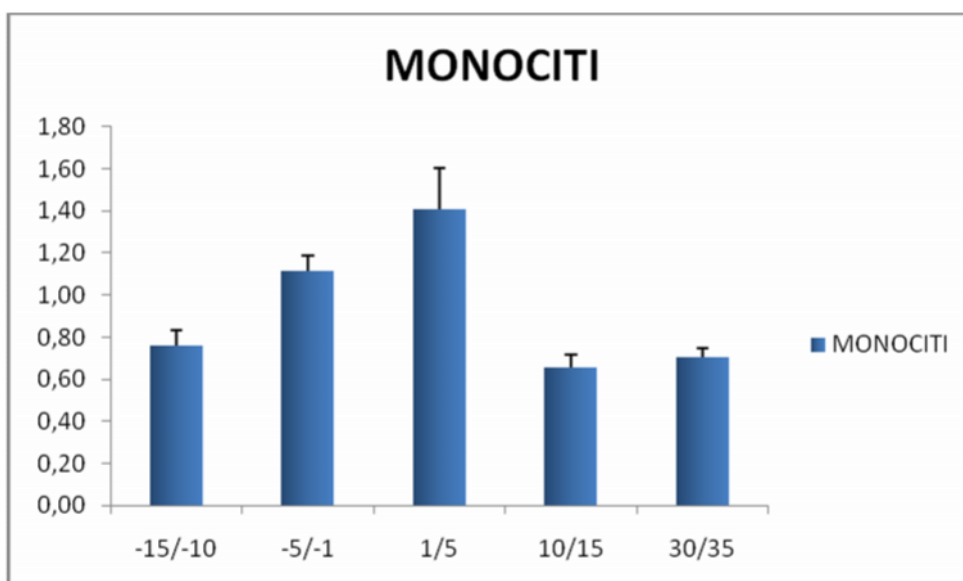


Fig. C.4 Andamento dei monociti durante il periodo oggetto di studio

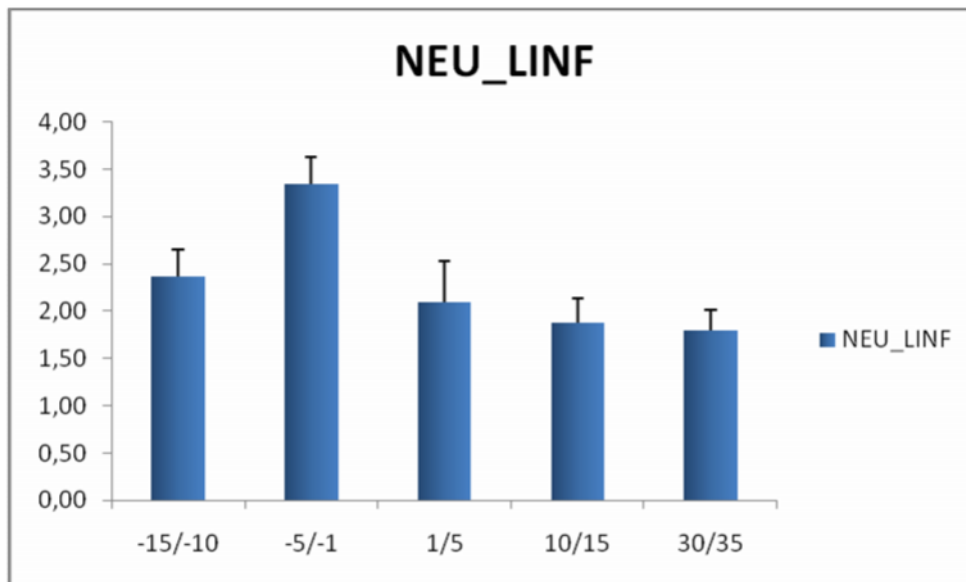


Fig. C.5 Andamento del rapporto neutrofili/linfociti durante il periodo oggetto di studio

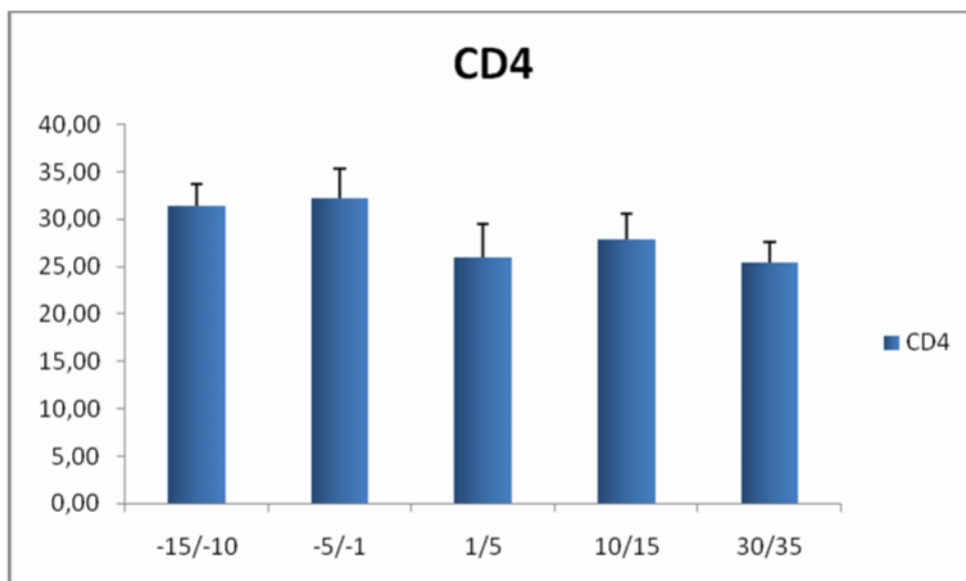


Fig. C.6 Andamento dei CD4⁺ durante il periodo oggetto di studio

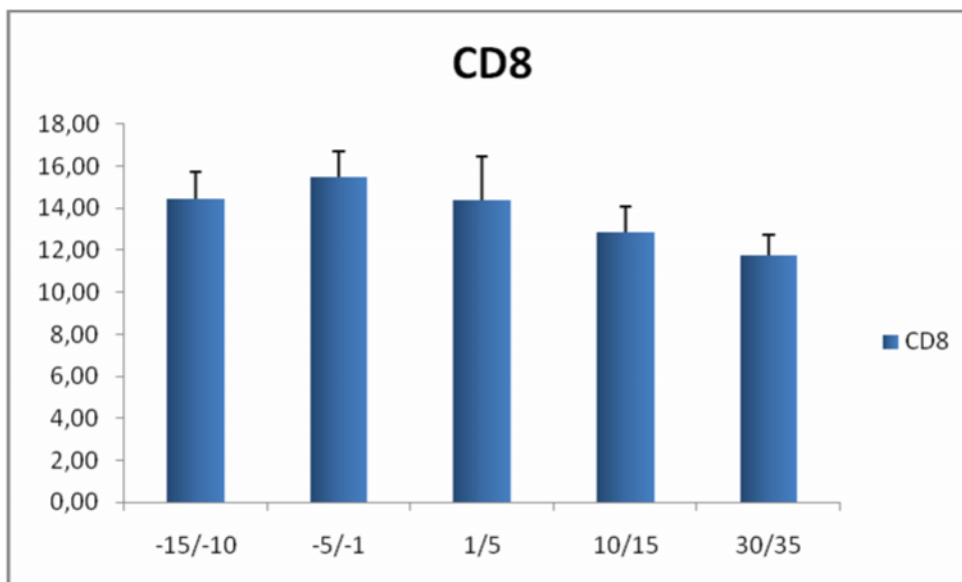


Fig. C.7 Andamento dei CD8⁺ durante il periodo oggetto di studio

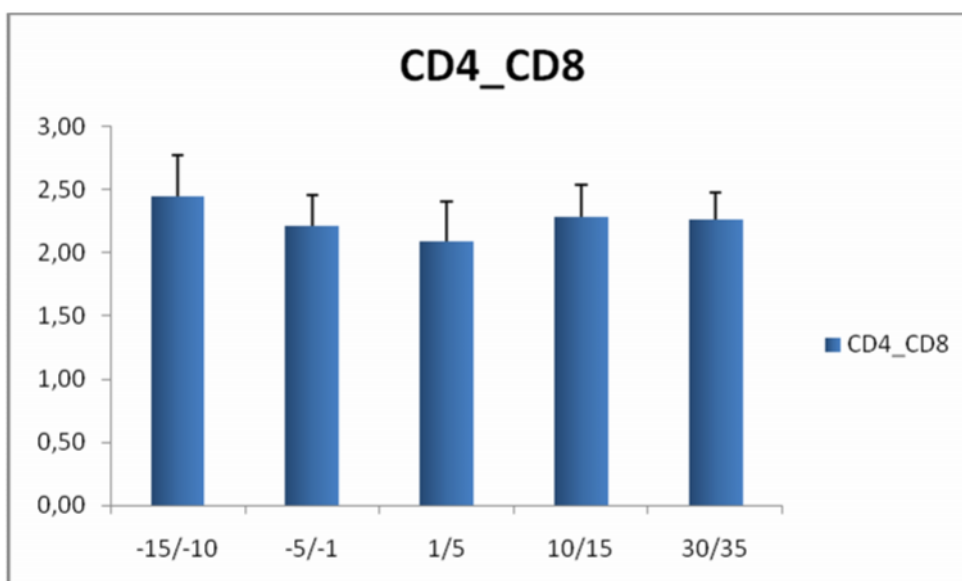


Fig. C.8 Andamento del rapporto CD4/CD8 durante il periodo oggetto di studio

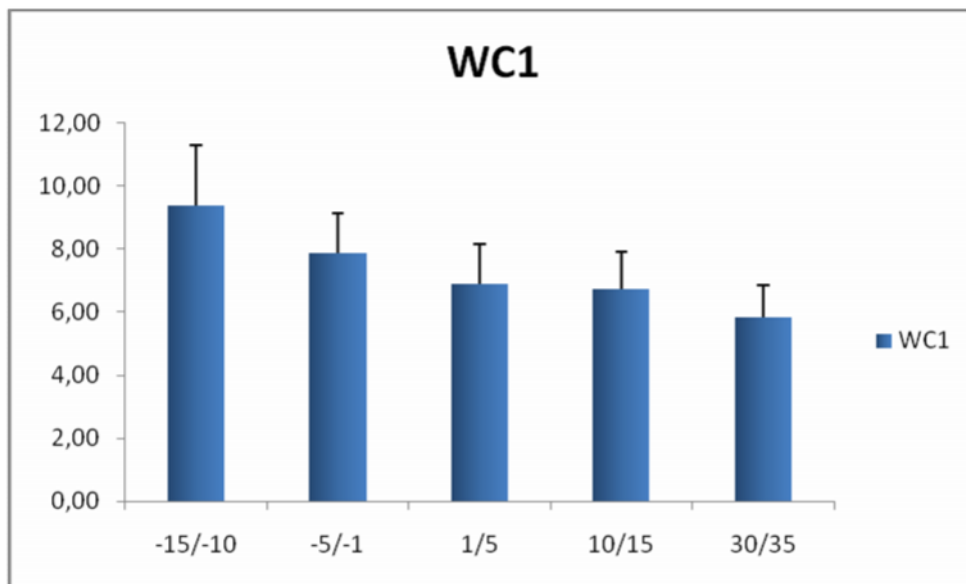


Fig. C.9 Andamento dei WC1 durante il periodo oggetto di studio

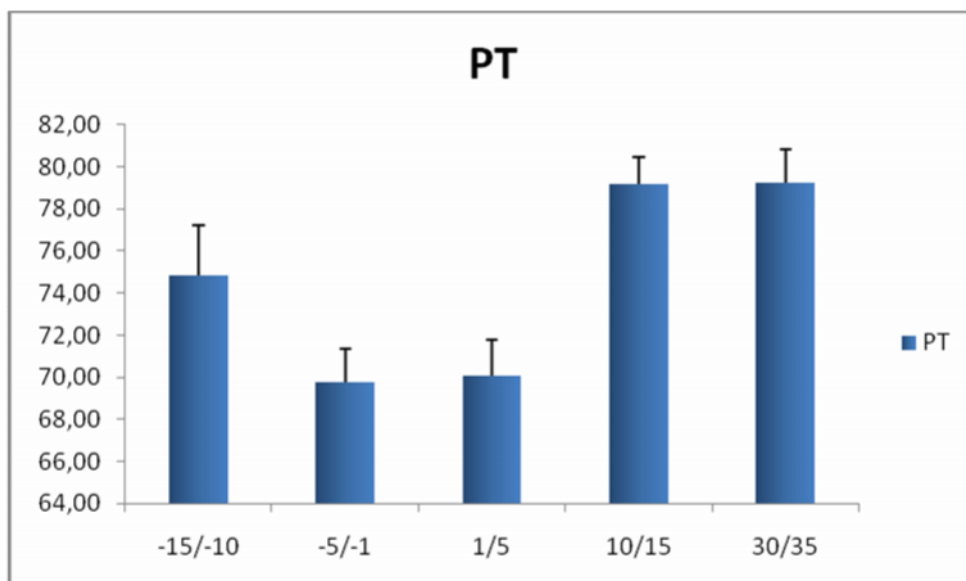


Fig. C.10 Andamento delle proteine totali durante il periodo oggetto di studio

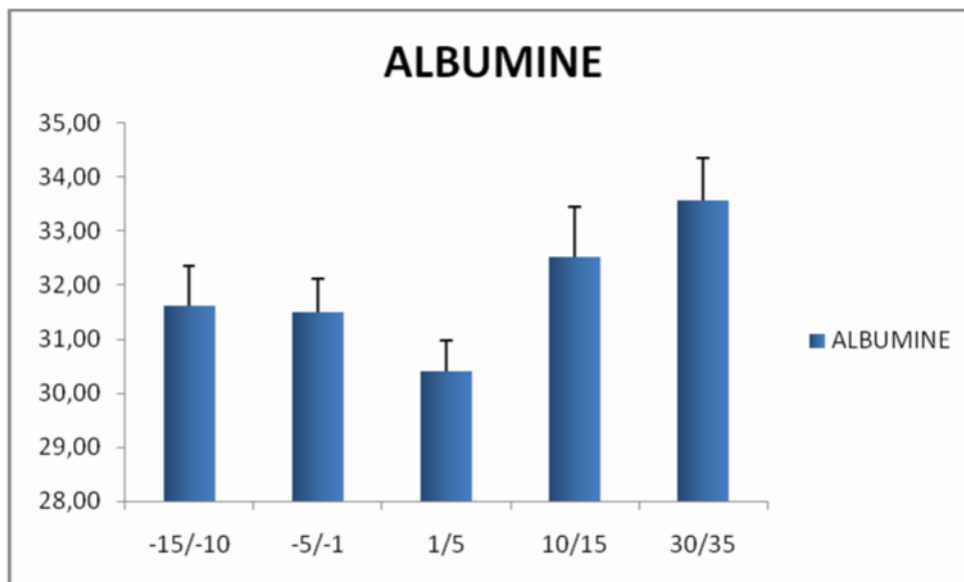


Fig. C.11 Andamento delle albumine durante il periodo oggetto di studio

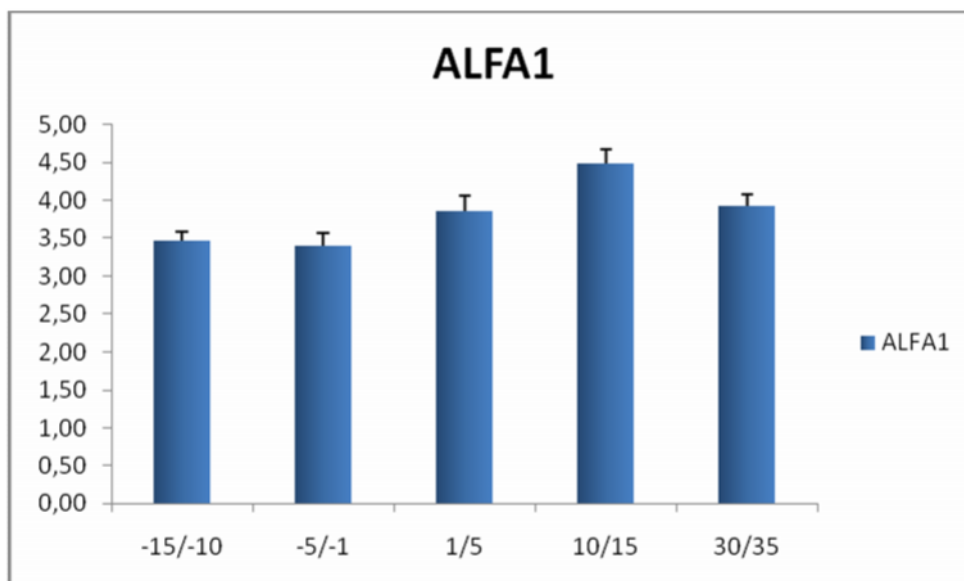


Fig. C.12 Andamento delle alfa 1 durante il periodo oggetto di studio

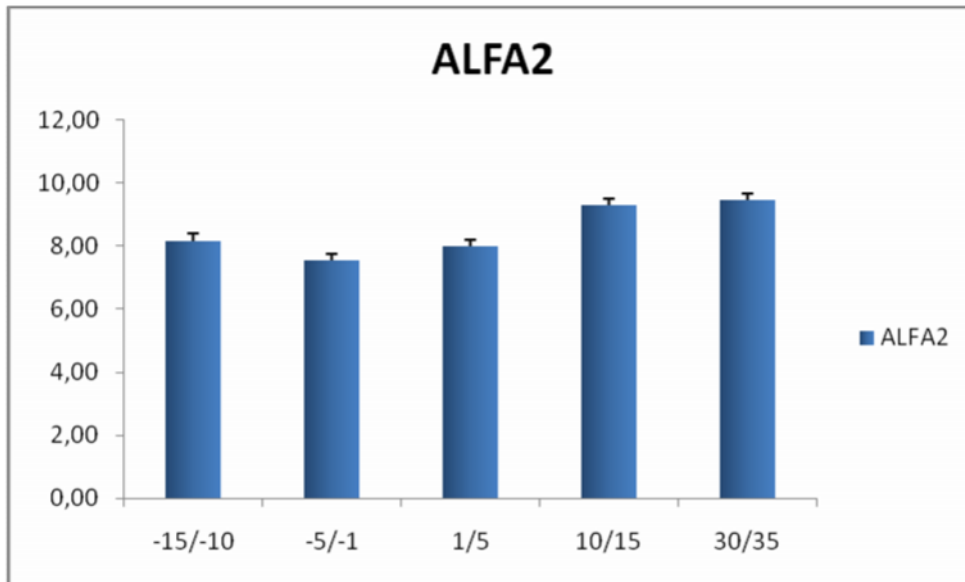


Fig. C.13 Andamento delle alfa 2 durante il periodo oggetto di studio

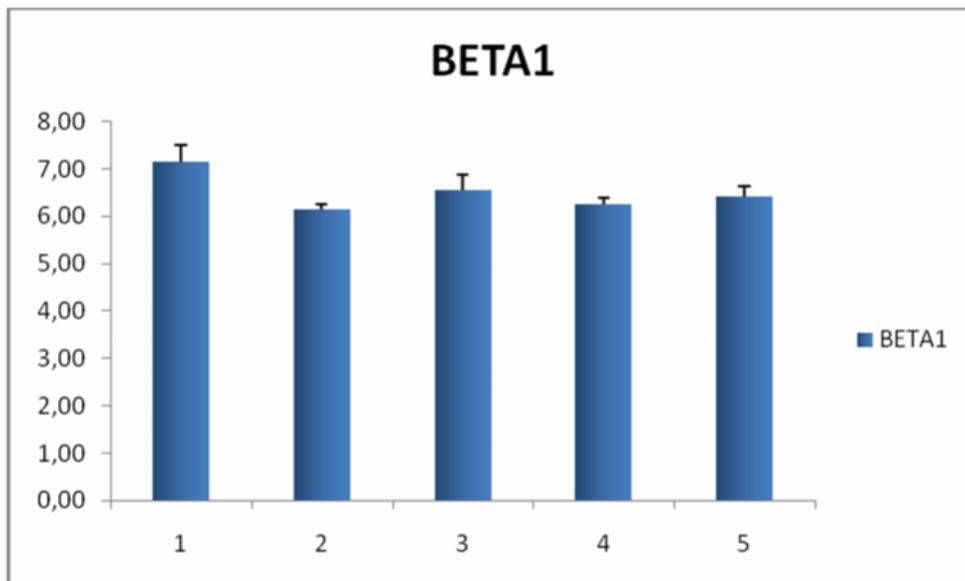


Fig. C.14 Andamento delle beta 1 durante il periodo oggetto di studio

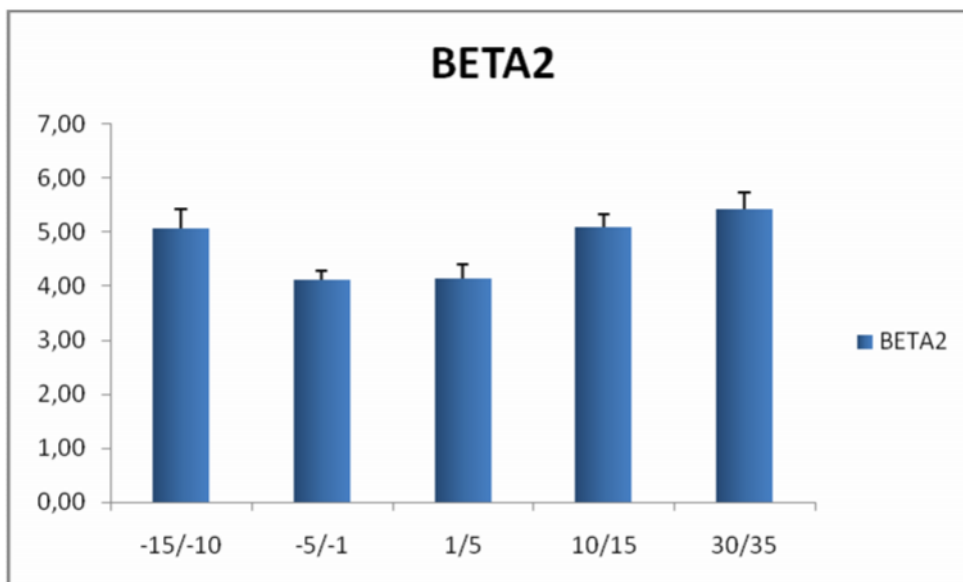


Fig. C.15 Andamento delle beta 2 durante il periodo oggetto di studio

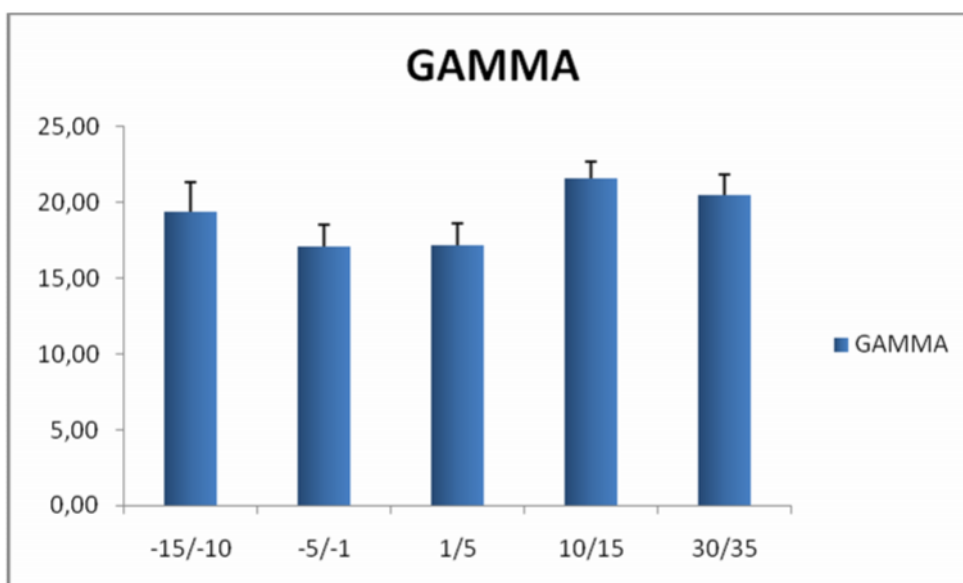


Fig. C.16 Andamento delle gamma durante il periodo oggetto di studio

BIBLIOGRAFIA

- **Abbas A. K., Litchman A. H.,** (2001). Functions and disorders of the immune system Ed. PICCIN.
- **Aguggini G., Beghelli V., Giulio L.F.,** (1998). Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. UTET, Torino.
- **Archetti I.L., Ravarotto L.,** (2002). Esame emocromocitometrico e formula leucocitaria mediante strumento CELL-DYN 3500®. In: La valutazione del benessere nella specie bovina Amadori M. e Archetti I. A cura di Fondazioni Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche Brescia. Pp. 95-107.
- **Asai K., Kai K., Rikiishi H., Sugawara S., Maruyama Y., Yamaguchi T., Ohta M., Kumagai K.,** (1998). Variation in CD4⁺ T and CD8⁺ lymphocyte subpopulation in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 65: 51-61.
- **Baldwin C.L., Sathiyaseelan T., Rocchi M., McKeever D.,** (2000). Rapid change occur in the percentage of circulating bovine WC1⁺ gamma delta Th1 cells. *Research in Veterinary Science*, 69: 175-180
- **Barkema H.W., Schukken Y.H., Lam T.J.G.M., Beiober M.L., Benedictus G., Brand A.,** (1998). Management practices associated with low, mid, and high bulk milk somatic cells count. *Journal of Dairy Science*, 81: 1917-1927.
- **Bauman D.E., and Currie W.B.,** (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, 63: 1514
- **Bauman D.E., and Elliot J.M.,** (1983). Control of nutrient partitioning in lactating ruminants. In: T. B. Mepham (Ed.) *Biochemistry of Lactation*. Pp 437. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- **Bauman D.E., and Vernon R G.,** (1993). Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. *Annual Review of Nutrition*, 13: 437.
- **Bauman D.E., Peel C.J., Steinhour W.D., Reynolds P J., Tyrrell H.F., Brown A.C.G., and Haaland G.L.,** (1988). Effect of bovine somatotropin on metabolism of lactating dairy cows: influence on rates of irreversible loss and oxidation of glucose and nonesterified fatty acids. *Journal of Nutrition*, 118: 1031.

- **Beede D.K., Sanchez W.K., Wang C.,** (1992). Macrominerals. In: Van Horn H.H. e Wilcox C.J. (eds.) Large Dairy Herd Management. American Dairy Science Association, Champaign, IL, Pp. 272-286.
- **Bell A.W.,** (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation; Journal of Animal Science, 73: 2804-2819.
- **Bell A.W., Slepetic R., Ehrhardt R.A.,** (1995). Growth and accretion of energy and protein in the gravid uterus during late pregnancy in Holstein cows. Journal of Dairy Science, 78: 1954-1961.
- **Bernabucci U., Scalia D., Franci O., Ronchi B., Nardone A., Lacetera N.,** (2002). Effects of nonesterified fatty acids on lymphocyte functions in dairy heifers. Journal of Animal Science, 80 (Suppl. 1) Journal of Dairy Science 85 (Suppl. 1), 189 (abs).
- **Bertics S. J., Grummer R.R., Cadorniga-Valino C., and Stoddard E.E.,** (1992). Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. Journal of Dairy Science, 75: 1914.
- **Bertoni G.,** (1979). Alimentazione delle bovine in asciutta. Agricoltura Ricerca 2: 50-56.
- **Bertoni G.,** (2003). Dismetabolie puerperali e rapporti con il sistema immunitario, l'attività epatica e la riproduzione. In: La ipofertilità della bovina da latte Bertoni G. A cura di Fondazioni Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche Brescia. Pp. 67-91.
- **Bertoni G., Calamari L., Trevisi E.,** (2000). Alterazioni della funzionalità epatica nel puerperio e conseguenze sulla fertilità della bovina. RAIZ, La riproduzione in zootecnia, Volume terzo, G. Enne, G. Rossi, Pp. 195-208.
- **Bertoni G., Trevisi E.,** (1997). Le principali malattie metaboliche delle lattifere e la loro prevenzione. L'Informatore Agrario, 53 (suppl. n°47): 1-34.
- **Bickerstaffe R., Annison E.F., and Linzell J.L.,** (1974). The metabolism of glucose, acetate, lipids and amino acids in lactating dairy cows. Journal of Agricultural Science, 82: 71.
- **Bosclair Y. R., Dunshea F.R., Bell A.W., Bauman D.E., and Harkins M.,** (1989). Effect of bovine somatotropin on glucose metabolism in steers. FASEB J. 3:A938 (Abstr.).
- **Burton J. L., and Kehrli M.E. Jr.,** (1995). Regulation of neutrophil adhesion molecules and shedding of "*Staphylococcus aureus*" in milk of cortisol- and dexamethasone-treated cows. American Journal of Veterinary Research, 56:997-1006.
- **Burton J. L., McBride B.W., Kennedy B.W., Burton J.H., Elsasser T.H., and Woodward B.,** (1991). Influence of exogenous bovine somatotropin on the responsiveness of peripheral blood lymphocytes to mitogen. Journal of Dairy Science, 74: 916-928.

- **Burvenich C., Van Merris V., Mehrzad J., Diez-Fraile A., Dunchateau L., (2003).**
Severity of E. coli mastitis in mainly determined by cow factor. *Veterinary Research*, 34: 521-562.
- **Calder P.C., Jackson A.A., (2000).** Undernutrition, infection and immune function.
Nutrition Research Reviews, 13: 3-29.
- **Calderone D., Pezzi P., Pancioli A., Quarella, M., Formigoni A., (1998).** Preliminary studies on «Oxidative status» in dairy cows. Proceedings of “X MittleEuropean Congress of Buiatrics”, Hungary 21-24 May 1998.
- **Cappa V., Trevisi E., Bertoni G., (1989).** Variazioni ematiche e produttive nel 1° mese di lattazione in bovine di allevamenti con o senza problemi «post-partum». *Zootecnia e Nutrizione Animale*, 15: 645-660.
- **Chandra R.K., (1991).** Nutrition and immunity in the elderly. *Nutrition Research Reviews*, 4:83-95.
- **Chang X., Mallard B.A., and Mowat D.N., (1996).** Effects of chromium on health status, blood neutrophil phagocytosis and in vitro lymphocyte blastogenesis of dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 52:37–52.
- **Chew B. P., Erb R.E., Fessler J.F., Callahan C.J., and Malven P.V., (1979).** Effects of ovariectomy during pregnancy and of prematurely induced parturition on progesterone, estrogens, and calving traits. *Journal of Dairy Science*, 62: 557.
- **Chiesa F., Gaiani R., Formigoni A., Accorsi P.A., (1991).** Modificazioni del quadro endocrino e metabolico in bovine da latte ad elevata potenzialità produttiva durante l’asciutta e la lattazione. *Archivio Veterinario Italiano*, 42, (4): 157-179.
- **Coppock C. E., Noller C.H., Wolfe S.A., Callahan C.J., and Baker J.S., (1972).** Effect of forage-concentrate ratio in complete feeds fed ad libitum on feed intake prepartum and the occurrence of abomasal displacement in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 55: 783.
- **Curtis C.R., Erb H., Sniffen C., Smith R., Powers P., Smith M., White M., Hillman R., Pearson E., (1993).** Association of periparturient Hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 5: 559
- **Davis A. J., Fleet I.R., Goode J.A., Hamon M.H., Maule Walker F.M., and Peaker M., (1979).** Changes in mammary function at the onset of lactation in the goat: correlation with hormonal changes *J. Physiol.*, 288: 33.

- **Debras E., Grizard J., Aina E., Tesseraud S., Champredon C., and Amal M., (1989).**
Insulin sensitivity and responsiveness during lactation and dry period in goats. *Am. J. Physiol.* 256: E295.
- **Drackley J. K., (1999)** Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier; *Journal of dairy science* 82: 2259-2273.
- **Dunshea F. R., Bell A.W., and Trigg T.E., (1988).** Relations between plasma non-esterified fatty acid metabolism and body tissue mobilization during chronic undernutrition in goats. *Br. J. Nutr.* 60: 633.
- **Elsasser T.H., Kahl S., Steele N.C., Rumsey T.S., (1997).** Nutritional modulation of somatotrophic axis-cytokine relationships in cattle: a brief review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 116A(3): 209-221.
- **Emery R. S., (1993).** Energy needs of dry cows. In: *Proc. Tri-State Dairy Nutr. Conf.* Pp. 35. Ohio State Univ., Michigan State Univ., and Purdue Univ., Ft. Wayne, IN.
- **Faulkner, A., and Pollock H.T., (1990).** Metabolic responses to euglycaemic hyperinsulinaemia in lactating and non-lactating sheep in vivo. *J. Endocrinol.* 124: 59.
- **Ferrell, C. L., (1991).** Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: **11.** Blood flow and nutrient flux. *Journal of Animal Science*, 69:1954.
- **Flynn J.L., Chan J., Tribold K.J., Dalton D.K., Stewart T.A., Bloom B.R., (1993).** An essential role for interferon- γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.* 178: 2249-2254.
- **Forbes J. M., (1986).** The effects of sex hormones, pregnancy, and lactation on digestion, metabolism, and voluntary food intake. In: L. P. Milligan, W. L. Grovum and A. Dobson (Ed.) *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants.* Pp 420. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- **Fourdraine R.H., Jordan, E.R., (1993).** Characterization of the management practices of the top milk producing herds in the country. *Journal of Dairy Science*, 76: 3247-3256.
- **Garcia de la Asuncion, J., Devesa A., Vina J.R., and Barber T., (1994).** Hepatic amino acid uptake in the lactating rat: Studies in vivo and in vitro. *J. Nutr.* 124: 2163.
- **Goff J.P., Horst R.L., (1997).** Physiological changes at parturition and their relationships to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science*, 80: 1260-1268.
- **Goodeeris B. et al., (1996).** Immunology of cattle. In Ed. Pastoret PP. et al. *Handbook of Vertebrate Immunology.* Academic Press Limited, Pp. 439-71.

- **Gorewit R.C., Aromando M.C., Bristol D.G.,** (1989). Measuring bovine mammary gland blood flow using a transit time ultrasonic flow probe. *Journal of Dairy Science*, 72: 1918-1928.
- **Griffin J.F.T.,** (1989). Stress and immunity: a unifying concept. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 20: 263-312.
- **Grimble R.F.,** (1998). Modification of inflammatory aspects of immune function by nutrients. *Nutrition Research*, 18: 1297-1317.
- **Grummer R.R.,** (1995). Impact of change in organic nutrient metabolism on feeding the transition cow. *Journal of Animal Science*, 73: 2820-2833.
- **Grummer, R.R.,** (1993). Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 76: 3882.
- **Grummer, R.R., Bertics S.J., Lacount D.W., Snow J.A., Dentine M.R, and Stauffacher R.H.,** (1990). Estrogen induction of fatty liver in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 73: 1537.
- **Guidry A. J., Paape M.J., and Pearson R.E.,** (1976). Effects of parturition and lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids, and neutrophil phagocytosis in the cow. *American Journal of Veterinary Research*, 37: 1195-1200.
- **Guidry A.J., Paape M.J., Pearson R.E.,** (1976). Effects of parturition and lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids, and neutrophil phagocytosis in the cow. *American Journal of Veterinary Research*, 37; 1196:1200.
- **Halliwell R.E.W and Gorman N.T.,** (1989). *Veterinary Clinical Immunology*. W.B. Saunders Company Philadelphia.
- **Harp J.A., Kehrli Jr. M.E., Hurley D.J., Wilson R.A., Bonne T.C.,** (1991). Numbers and percent of T lymphocytes in bovine peripheral blood during the periparturient period. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 28: 29-35.
- **Hart I. C., Bines J.A., Morant S.V., and Ridley J.L.,** (1978). Endocrine control of energy metabolism in the cow: Comparison of the levels of hormones (prolactin, growth hormone, insulin and thyroxine) and metabolites in the plasma of high- and lowyielding cattle at various stages of lactation. *J. Endocrinol.* 77: 333.
- **Hay W.W. Jr., Sparks J.W., Wilkening R.B., Battaglia F.C., and Meschia G.,** (1984). Fetal glucose uptake and utilization as functions of maternal glucose concentration. *American Journal of Physiology*. 246:E237.

- **Hernandez-Urdaneta A., Coppock C.E., McDowell R.E., Gianola D., and Smith N.E.,** (1976). Changes in forage-concentrate ratio of complete feeds for dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 59: 695.
- **Heyneman R., Burvensich C., and Vercauteren R.,** (1990). Interaction between the respiratory burst activity of neutrophil leukocytes and experimentally induced “*Escherichia coli*” mastitis in cows. *Journal of Dairy Science*, 73: 985-994.
- **Ingvartsen K.L., Dewhurst R.J., 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.
- **Ishikawa H.,** (1987). Observation of lymphocyte function in perinatal cows and neonatal calves. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49: 469-475.
- **Johnson D.G., and Otterby D.E.,** (1981). Influence of dry period diet on early postpartum health, feed intake, milk production, and reproductive efficiency of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 64: 290.
- **Jordan E.R., Fourdraine R.H.,** (1993). Characterization of the management practices of the top milk producing herds in the country. *Journal of Dairy Science*, 76: 3247-3256.
- **Karcher E.L., Beitz D.C., Stabel J.R.,** (2008). Parturition invokes changes in peripheral blood mononuclear cell populations in Holstein dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 124: 50-62.
- **Kashiwazaki Y., Maede Y., and Namioka S.,** (1985). Transformation of bovine peripheral blood lymphocytes in the perinatal period. *Japanese Journal of Veterinary Science*, 47: 337-339.
- **Kehrli Jr. M.E., Nonnecke B.J., Roth J.A.,** (1989b) . Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *American Journal of Veterinary. Research*, 50: 207-214.
- **Kehrli Jr. M.E., Kimura K., Goff J.P., Stabel J.R., Nonnecke B.J.,** (1998). Periparturient immunosuppression in dairy cows: nutrition and lactation effects. In: Wensing, Th (Ed), *Production diseases in farm animals, proceedings of the 10th international conference the Netherlands*.
- **Kehrli Jr. M.E., Nonnecke B.J, Roth J.A.,** (1989a). Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *American Journal of Veterinary. Research*, 50: 215-220.

- **Kimura K., Goff J.P., Kehrli Jr. M. E., Harp J.A.,** (1999). Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82: 315-319.
- **Kimura K., Goff J.P., Kehrli Jr. M. E., Harp J.A., Nonnecke B.J.,** (2002). Effects of mastectomy on composition of peripheral blood mononuclear cell population in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 85: 1437-1444.
- **Knapp J.R., Freetly H.C., Reis B.L., Calvert C.C., and Baldwin R.,** (1992). Effects of somatotropin and substrates on patterns of liver metabolism in lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 75: 1025.
- **Koets A., Rutter V., Hoek A., Van Mil F., Muller K., Bakker D., Gruys E., Van Eden W.,** (2002). Progressive bovine paratuberculosis is associated with local loss of CD4⁺ T-cells, increased frequency of T-cells, and related changes in T-cells function. *Infect and immunity*
- **Kunz P.L., Blum J.W., Hart I.C., Bickel H., and Landis J.,** (1985). Effects of different energy intakes before and after calving on food intake, performance and blood hormones and metabolites in dairy cows. *Animal Production*, 40: 219.
- **Lacetera N., Franci O., Scalia D., Bernabucci U., Ronchi B., Nardone A.,** (2002). Effects of nonesterified fatty acids and b-hydroxybutyrate on functions of mononuclear cells obtained from ewes. *American Journal of Veterinary Research*, 63(3): 414-418.
- **Lemons J.A., and Schreiner R.L.,** (1983). Amino acid metabolism in the ovine fetus. *Am. J. Physiol.* 244: E459.
- **Leury B. J., Bird A.R., Chandler K.D., and Bell A.W.,** (1990) .Glucose partitioning in the pregnant ewe: Effects of undernutrition and exercise. *Br. J. Nutr*, 64: 449.
- **Lippolis J.D.,** (2008). Immunological signaling networks: Integrating the body's immune. *Journal of Animal Science*, 86: E53-E63.
- **Mallard B.A., Dekkers J.C., Ireland M.J, Leslie K.E., Sharif S., Lacey Vamkampen C., Wagter L., Wilkie B.N.,** (1998). Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *Journal of Dairy Science*, 81: 585-595.
- **Mallard B.A., Wagter L.C., Ireland M.J., Dekkers J.C.,** (1997). Effects of growth hormone, insulin-like factor-1 and cortisol on periparturient antibody response profiles on dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 60: 61-76.

- **Meglia G.E., Johannisson A.S., Holtenius K., Persson W.K.,** (2005). Effects of feeding intensity during the dry period on leukocyte and lymphocyte sub-populations, neutrophil function and health in peripartum dairy cows. *Veterinary Journal*, 169: 376-384.
- **Mehrzaad J., Dosogne H., Meyer E., Heyneman R., and Burvenich C.,** (2001). Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation. *Journal of Dairy Research*, 68: 399-415.
- **Mehrzaad J., Duchateau L., Pyörälä S., Burvenich C.,** (2002). Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparus and pluriparus dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *Journal of Dairy Science*, 85: 3268-3276.
- **Mehrzaad J., Zhao X.,** (2008). T lymphocytes proliferative capacity and CD4+/CD8+ ratio in primiparus and pluriparus lactating cows. *Journal of Dairy Research*, 75: 457-465.
- **Meschia G., Battaglia F.C., Hay W.W. Jr., and Sparks J.W.,** (1980). Utilization of substrates by the ovine placenta in vivo. *Fed.Proc.*, 39:245.
- **Metcalf J.A., Roberts S.J., Sutton D.J.,** (1992). Variations in blood flow to and from the bovine mammary gland measured using transit time ultrasound and dye dilution. *Research of Veterinary Science*, 53: 59-63.
- **Miller P.S., Reis B.L., Calvert C.C., DePeters E.J., and Baldwin R.L.,** (1991). Relationship of early lactation and bovine somatotropin on nutrient uptake by cow mammary glands. *Journal of Dairy Science*, 74: 3800.
- **Mollinedo F., Borregaard N., and Boxer L.A.,** (1999). Novel trends in neutrophil structure, function and development. *Immunology Today*, 20: 535-537.
- **Morrison W.I.,** (1986). *The ruminant immune system in health and disease.* University Press Cambridge.
- **Nagahata H., Makino S., Takeda S., Takahashi H., and Noda H.,** (1988). Assessment of neutrophil function in the dairy cow during the perinatal period. *Journal of Veterinary Medical B* 35: 747-751.
- **Newbould, F.H.S.,** (1976). Phagocytic activity of bovine leukocytes during pregnancy. *Can. J. Comp Med.* 40: 111-116.
- **O'Flaherty L., Bouchier-Hayes D.J.,** (1999). Immunonutrition and surgical practice. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58: 831-837.
- **Ohtsuka H. Watanabe C., Kohiruimaki M., Ando T., Watanabe D., Masui M., Hayashi T., Abe R., Koiwa M., Sato S., Kawamura S.,** (2006). Comparison of two different

- nutritive conditions against the change in peripheral blood mononuclear cell of periparturient dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science* 68: 1161-1166.
- **Overton T.R.**, (2002). Transition cow programs- Management and metabolism. In: 17th Annual Southwest Nutrition and Management Conference.
 - **Paape M.J., Bannerman D.D., Zhao X., and Lee J.W.**, (2003). The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Journal of Veterinary Research*. 34: 597-627.
 - **Park Y.H., Fox L K., Hamilton M.J, and Davies W.C.**, (1992). Bovine mononuclear leukocyte subpopulation in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *Journal of Dairy Science*, 75: 998-1006.
 - **Patton K.M, McGuire T.C., Fraser D.G., Hines S.A.**, (2004). Rhodococcus equi-infected macrophage are recognized and killed by CD8⁺ T lymphocytes in a major histocompatibility complex class I-unrestricted fashion. *Infection and Immunity*, 72: 7073-7083.
 - **Perssonwaller K.**, (2000). Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics. *Biology of the mammary gland* (edited by J.A. Mol, R.A. Clegg), Kluwer Academic/Plenum Publishers: 231-245.
 - **Pocius P.A., and Herbein J.H.**, (1986). Effects of in vivo administration of growth hormone on milk production and in vitro hepatic *Journal of Dairy Science* 69:713.
 - **Poli G., Cocilovo A.**, (1996). *Microbiologia e Immunologia Veterinaria*. UTET.
 - **Pollock J.M. and Welsh M.D.**, (2002). The WC1⁺ T-cell population in cattle: a possible role in resistance to intracellular infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 89: 105-114
 - **Pullen D.L., Palmquist D.L., and Emery R.S.**, (1989). Effect of days of lactation and methionine hydroxy analog on incorporation of plasma fatty acids into plasma triglycerides. *Journal of Dairy Science*, 72: 49.
 - **Reynolds L.P., Ferrell C.L., Robertson D.A., and Ford S.P.**, (1986). Metabolism of the gravid uterus, foetus and utero-placenta at several stages of gestation in cows. *Journal of Agricultural Science*, 106: 437.
 - **Riollet C., Rainard P., Poutrel B.**, (2000). Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Biology of the mammary gland* (edited by J.A. Mol, R.A. Clegg), Kluwer Academic/Plenum Publishers: 247-258.
 - **Rivas A.L., Quimby F.W., Coksaygan O., Olmstead L., Lein D.H.**, Longitudinal evaluation of CD4⁺ and CD8⁺ peripheral blood and mammary gland lymphocytes in

- cows experimentally inoculated with *Staphylococcus aureus* (2000); The Canadian Journal of Veterinary Research 64:232-237
- **Saad, A.M., Concha C., and Strom G. A.,** (1989). Alterations in neutrophil phagocytosis and lymphocyte blastogenesis in dairy cows around parturition. Journal of Veterinary Medial., 36: 337-345.
 - **Sechen S.J., Dunshea F.R., and Bauman D.E.,** (1990). Somatotropin in lactating cows: Effect on response to epinephrine and insulin. American Journal of Physiology, 258: E582.
 - **Segal A.W.,** (2005). How neutrophils kill microbes. Annual Review of Immunology,23: 197-223.
 - **Shuster D.E., Lee E.K., and Kehrli M.E .Jr.,** (1996). Bacterial growth,inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitmentduring coliform mastitis in cows within ten days after calving,compared with cows at midlactation. American Journal of Veterinary Research.,57: 1569-1575.
 - **Singh J., Murray R.D., Mshelia G., Woldehiwet Z.,** (2008). The immune status of the bovine uterus during peripartum period. The Veterinary Journal 175: 301-309.
 - **Smith G.S.,** (2000). Neutrophils. Pp. 281–296 in Schalm’s Veterinary Hematology. B. F. Feldman, J. G. Zinkl, and N. C. Jain, ed. Lippincott Williams & Wilking, Philadelphia, PA.
 - **Smith R.A., Kreeger J.M., Alvarez A.J., Goin J.C., Davis W.C., Whipple D.L., Estes D.M.,** (1999). Role of CD8⁺ and WC1⁺ gamma/delta T cells in resistance to *Mycobacterium bovis* infection in the SCID-bo mouse. Journal of Leukocyte Biology, 65: 28-34.
 - **Spain J.N., Scheer W.A.,** (2002). The 100-Day Contract with the Dairy Cow: 30 Days Parturium to 70 Days postpartum. In: Advances in Dairy Technology. Pp.19-42.
 - **Stacey T.E., Weedon A.P., Haworth C., Ward R.H.T., and Boyd R.D.H.,** (1978). Fetomaternal transfer of glucose analogues by sheep placenta. American Journal of Physiology, 234: E32
 - **Steppan C.M., Lazar M.A.,** (2002). Resistin and obesity-associated insulin resistance. Trends in Endocrinology and Metabolism, 13: 18-23.
 - **Stuehr D.J., Marletta M.A.,** (1987). Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon- . Journal of Immunology, 139: 518-525.

- **Teale A.J., Baldwin C.L., Morrison W.I., Ellis J., and Machugh N.D.,** (1987) Phenotypic and functional characteristics of bovine t lymphocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 17: 113-123
- **Tizard I.R.,** *Veterinary immunology*, (2000). Elsevier edition.
- **Trevisi E., Calamari L., Iamartino N., Bertoni G.,** (1998). Sintesi epatiche nel post-parto della bovina: possibili cause di variazione e relazione con la fertilità. Proc. X Meeting Nazionale su “Studio della efficienza riproduttiva degli animali di interesse zootecnico”. Bergamo, 12.06.1998,10: 37-41.
- **Trevisi E., Han X.T., Piccioli-Cappelli F., Bertoni G.,** (2002). Dry matter intake reduction before calving in dairy cows: relationship with immune system and metabolism conditions. 53rd Annual Meeting EAAP, Cairo, Egypt, September 1-4 2002.
- **Tucker, H. A.,** (1985). Endocrine and neural control of the mammary gland. In: B. L. Larson (Ed.) *Lactation*. Pp. 39. Iowa State University Press, Ames.
- **Van Kampen C.V., Mallard B.A.,** (1997). Effects of periparturient stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 59: 79-91.
- **Vazquez-Anon M., Bertics S., Luck M., and Grummer R.R.,** (1994) Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 77: 1521.
- **Vernon, R.G., Faulkner A., Hay, W.W. Jr., Calvert D.T., and Flint D.J.,** (1990). Insulin resistance of hind-limb tissues in vivo in lactating sheep. *Biochemical Journal*, 270:283.
- **Wagter, L.C., Mallard B.A., Dekkers J.C.M., Leslie K.E., and Wilkie B.N.,** (1996). Characterization of immune responsiveness and disease occurrence during the peripartum period. *Journal of Dairy Science*. 79(Suppl. 1): 119.(Abstr.).
- **Williamson, D.H., and Lund P.,** (1994). Cellular mechanisms of lipid metabolism in pregnancy and lactation. In: L. Allen, J. Kng, and B. Lonnerdal (Ed. *i Nutrient Regulation During Pregnancy, Lactation and Infant Growth*. Pp 45. Plenum Press, New York.
- **Wolkers M.C., Brouwenstijn N., Bakker A.H., Toebes M., Schumacher T.N.,** (2004). Antigen bias in T cell cross-priming. *Science*, 304: 1314-1317.
- **Yang T.J., Ayoub Ihsan A., Rewinski M.J.,** (1997). Lactation stage dependent changes of lymphocyte subpopulations in mammary secretions: Inversion of CD4+/CD8+ T cell ration at parturition. *American Journal of reproductive immunology*, 37: 378-383.
- **Zecconi A.,** (2007). Le cellule somatiche nel latte influenzano sanità e qualità. *L’informatore Agrario*, 8: 66-69.

- **Zecconi A., Bronzo V., Piccinini R., Spreafico G., and Ruffo G.,** (1994). Phagocytic activity of bovine polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Journal of Dairy Research*, 61: 271-279.
- **Zychlinsky A., Weinrauch Y., and Weiss J.,** (2003). Introduction: Forum in immunology on neutrophils. *Microbes Infect.* 5: 1289-1291.

8. RINGRAZIAMENTI

Giunta al termine di questa tesi desidero ringraziare ed esprimere la mia riconoscenza a tutte le persone che, in modi diversi, mi sono state vicine e hanno permesso e incoraggiato sia i miei studi che la realizzazione e la stesura di questa tesi.

Un primo doveroso ringraziamento va a chi ha permesso la realizzazione di questa tesi e in particolare:

- Al Prof. Gianfranco Gabai che mi ha dato l'opportunità di iniziare e di portare a termine questo lavoro impegnativo ma soddisfacente. Perché ha saputo incoraggiarmi e credere fin da subito nelle mie potenzialità.
- Ad Anna-Lisa e Letizia che sono state sempre disponibili e presenti, permettendomi di fare un'esperienza di tirocinio molto formativa e perché no anche divertente. Ad Anna Lisa che mi ha dato preziosi suggerimenti e ha contribuito alla stesura e revisione di questa tesi. A Letizia che è sempre stata disponibile, soprattutto quando ce n'era più bisogno, sapendo essere un ottimo tramite tra gli allevatori e il lavoro che stavo portando avanti. Grazie Lety per i caffè, le chiacchierate i suggerimenti e le risate.
- Ai tecnici di laboratorio del laboratorio di chimica clinica: Elisabetta, Elena, Valentina e Zuleica perché nei due mesi di tirocinio trascorsi insieme hanno saputo insegnarmi una professione a me del tutto sconosciuta facendomi sentire a mio agio. Rimarrà un'esperienza significativa per me.
- Agli allevatori, che pur non conoscendoli, anche loro hanno contribuito alla riuscita di questo tesi.

Per ultimi, ma di certo non per importanza, ringrazio la mia famiglia e gli amici che mi sono stati molto vicini in questi tre anni di studio.

- Il mio primo pensiero va a i miei genitori a cui dedico questo lavoro di tesi: senza il loro aiuto non avrei mai raggiunto questa meta. Grazie perché mi avete sempre incoraggiato a credere in me stessa e a perseguire la strada che pensavate fosse giusta per me lasciandomi sempre la libertà di scegliere. Grazie perché mi avete supportato nelle scelte difficile e importanti della mia vita.
Ai miei fratelli Chiara, Francesco, Irene e Sofia perché sanno volermi bene così come sono ridonandomi, quando sono giù, il sorriso.

- Ai miei amici e in particolare a Anna con la quale abbiamo condiviso molto, soprattutto le ore di studio, perché quando non ce la facevo più c'era sempre per incoraggiarmi. A Giada che ha sempre creduto in me e ha saputo apprezzare fin da subito il progetto di questa tesi. Le discussioni sulla tesi e sugli argomenti scientifici che abbiamo fatto insieme sono state preziose per me.
A Silvia perché la sua presenza in questo ultimo mese è stata più che determinante. Grazie Silvia perché hai creduto fin da subito in me permettendomi di andare molto lontano. La tua disponibilità è stata essenziale, se non ci fossi stata tu molto di questo non ci sarebbe.
- A chi ha contribuito alla parte grafica della tesi: a Flavio che nonostante la sua salute cagionevole si è subito reso disponibile ad aiutarmi, insegnandomi molti “trucchetti” con il computer. A Riccardo Giovanni Silvia e Fabio che si sono resi disponibili per il power point.
- Ringrazio inoltre i miei compagni di corso con i quali ho condiviso questi 3 anni della mia vita in particolare: Agostino, Anna, Alberto, Francesca, Marica, Serena, Alessandro, Pierluigi e Maddalena.