



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN  
MEDICINA VETERINARIA

VARIAZIONE DEL PROFILO LIPIDICO NEL LATTE IN RELAZIONE ALLA  
CONCENTRAZIONE DI CORPI CHETONICI NEL PLASMA DI BOVINE DURANTE LA  
FASE DI TRANSIZIONE.

Relatore: Prof. Massimo Morgante

Correlatore: Dott. Enrico Fiore

Laureando: Luca Baldisseri

Matricola n. 1044423

ANNO ACCADEMICO 2017-18



# INDICE

1. ABSTRACT.....	1
2. RIASSUNTO.....	3
3. PREMESSA.....	5
PARTE GENERALE.....	7
4. INTRODUZIONE.....	9
4.1 Classificazione degli acidi grassi.....	10
4.2 Metabolismo lipidico nel bovino.....	12
4.3 Ruolo e variabilità degli acidi grassi nel latte.....	15
4.4 Calo dell'ingestione volontaria e NEB.....	17
4.5 Immunosoppressione durante il periodo di transizione.....	19
4.6 Patologie rilevanti durante il periodo di transizione.....	21
4.6.1 Collasso puerperale o sindrome ipocalcémica.....	23
4.6.2 Sindrome della vacca a terra.....	26
4.6.3 Chetosi bovina.....	27
4.6.4 Lipidosi epatica.....	30
4.6.5 Ritenzione placentare.....	32
4.6.6 Metrite.....	33
4.6.7 Dislocazione di abomaso.....	35
PARTE SPERIMENTALE.....	37
5. MATERIALI E METODI.....	39
5.1 Azienda e animali.....	39
5.2 Campionamenti ematici e valutazione della chetonemia sul campo.....	41
5.3 Prelievo dei campioni di latte .....	43
5.4 Valutazione del Body Condition Score.....	43
5.5 Analisi di laboratorio.....	45
5.6 Analisi statistica.....	46
6. RISULTATI.....	51
7. DISCUSSIONE.....	65
8. CONCLUSIONI.....	75
BIBLIOGRAFIA.....	77
RINGRAZIAMENTI.....	96



## 1. ABSTRACT

The aim of this study was to extend the limited research available on the association between the concentration of milk fatty acids and the elevated plasmatic value of  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) and non esterified fatty acids (NEFA) in early lactation of dairy cows.

54 Holstein Frisian dairy cows were enrolled in the study. Blood and milk samples were collected in the first part of the lactation (27,32 days in milk), in the morning (7.00 am), 3 hours after the feed distribution. All cows were classified as hyperketonemic if blood concentration were in BHB concentration higher or equal to 1,0 mmol/L (BHB-1, sick group) and in NEFA concentration higher or equal to 0,5 mEq/L (NEFA-1, sick group); in the opposite range the animal were classified as healthy cows (BHB-0 and NEFA-0). The fatty acids in the milk samples were analysed with the gas chromatography technique associated with flame ionization detector (FID). 146 fatty acids were evaluated and divided in 4 lipidic fractions: cholesterol esters (CE), phospholipids (PL), free fatty acids (FFA) and triglycerides (TG).

These profiles were used to investigate the diagnostic potential value of milk fatty acids for the correct classification of cows with BHB and NEFA concentrations, above the thresholds we have established (BHB<1,0 mmol/L and NEFA<0,5 mEq/L). Boruta Test and Receiver operating characteristic curves (ROC) were used to identify which fatty acids and their thresholds of concentration could be used when animals presented hyperchetonemia.

The research has identified the following parameters for an association with BHB-1 (thresholds; sensibility; specificity): C6 ( $\leq 0.311$ ; 100%; 74,19 %), C8 ( $\leq 0.937$ ; 93,33%; 74,19%), C14 ( $\leq 0.419$ ; 53,33%; 96,77%), C20:3 $\omega$ 6 ( $\leq 0.023$ ; 93,33%; 77,42%), C20:5 $\omega$ 3 ( $\leq 0.036$ ; 100%; 58,06%), C22 ( $\leq 0$ ; 93,33%; 77,42%), C22:1 $\omega$ 9 ( $\leq 0.049$ ; 100%; 67,74%), C22:5 $\omega$ 3 ( $\leq 0.036$ ; 93,33%; 80,65%), C23 ( $> 0$ ; 100%; 74,19%), C24 ( $\leq 0.080$ ; 100%; 61,29%) and mgFA/dl ( $\leq 24.140$ ; 86,67%; 74,19%) in CE fraction; C20:3 $\omega$ 3 ( $> 0.135$ ; 64,71%; 86,21%) and C20:4 $\omega$ 6 ( $> 1.747$ ; 76,47%; 74,19%) in FFA fraction; C6 ( $> 6.233$ ; 75%; 100%) and C22:1 $\omega$ 9 ( $\leq 0.04890$ ; 91,67%; 96,43%) in TG fraction.

Only the C17 ( $> 0.210$ ; 100%; 42,31%) in CE fraction was identified for an association with NEFA-1.

In conclusion, the research has identified the major fatty acids in milk with predictive values for the development of hyperketonemia. Further studies in the clinical and therapeutic approach will be necessary to evaluate if these predictive fatty acids change in relation on the administration of different diets or supplements, and administration of drugs that might improve the prevention of hyperchetonemia.



## 2. RIASSUNTO

Lo scopo di questo studio è stata quella di implementare le informazioni disponibili in merito alla relazione tra la concentrazione dei diversi acidi grassi presenti nel latte, delle bovine ad inizio lattazione, e le concentrazioni elevate di  $\beta$ -idrossibutirrato (BHB) e acidi grassi non esterificati (NEFA) a livello plasmatico.

Nello studio sono state arruolate 54 bovine di razza Frisona. I campioni di sangue e di latte sono stati raccolti nella fase di inizio lattazione (media di 27,32 giorni in latte), alle 7.00 del mattino, 3 ore dopo la distribuzione della razione. Tutte le bovine sono state classificate come iperchetonemiche se la concentrazione ematica del BHB era superiore o uguale a 1,0 mmol/L (BHB-1, gruppo patologico) e quella dei NEFA era superiore o uguale a 0,5 mEq/L (NEFA-1, gruppo patologico); le restanti bovine sono state classificate come sane (BHB-0 and NEFA-0).

Gli acidi grassi, presenti nei campioni di latte, sono stati analizzati in laboratorio con tecnica gas cromatografica associata a Flame Ionization Detector (FID). Sono stati valutati 146 acidi grassi, suddivisi in 4 classi lipidiche: esteri del colesterolo (CE), fosfolipidi (PL), acidi grassi liberi (FFA) e trigliceridi (TG). Questi profile lipidici sono stati impiegati per indagare il potenziale diagnostico degli acidi grassi presenti nel latte al fine di classificare correttamente le bovine con concentrazioni ematiche di BHB e NEFA al di sotto delle soglie prestabilite (BHB<1,0 mmol/L e NEFA<0,5 mEq/L). Abbiamo utilizzato il Test di Boruta e le curve Receiver operating characteristic (ROC) per identificare quali acidi grassi, con relative valori cut-off, potessero essere impiegati nell'individuare gli animali in iperchetonemia. Il lavoro di ricerca ha individuato i seguenti parametri con potere predittivo sul valore del BHB (valore cut-off; sensibilità; specificità): C6 ( $\leq 0.311$ ; 100%; 74,19 %), C8 ( $\leq 0.937$ ; 93,33%; 74,19%), C14 ( $\leq 0.419$ ; 53,33%; 96,77%), C20:3 $\omega$ 6 ( $\leq 0.023$ ; 93,33%; 77,42%), C20:5 $\omega$ 3 ( $\leq 0.036$ ; 100%; 58,06%), C22 ( $\leq 0$ ; 93,33%; 77,42%), C22:1 $\omega$ 9 ( $\leq 0.049$ ; 100%; 67,74%), C22:5 $\omega$ 3 ( $\leq 0.036$ ; 93,33%; 80,65%), C23 ( $> 0$ ; 100%; 74,19%), C24 ( $\leq 0.080$ ; 100%; 61,29%) e mgFA/dl ( $\leq 24.140$ ; 86,67%; 74,19%) per la classe degli esteri del colesterolo. C20:3 $\omega$ 3 ( $> 0.135$ ; 64,71%; 86,21%) e C20:4 $\omega$ 6 ( $> 1.747$ ; 76,47%; 74,19%) per la classe degli acidi grassi liberi. C6 ( $> 6.233$ ; 75%; 100%) e C22:1 $\omega$ 9 ( $\leq 0.04890$ ; 91,67%; 96,43%) per la classe dei trigliceridi.

Solamente l'acido grasso C17 ( $> 0.210$ ; 100%; 42,31%), appartenente alla frazione lipidica degli esteri del colesterolo, ha dimostrato un significativo potere predittivo sul valore dei NEFA.

In conclusione, il lavoro di ricerca ha portato all'identificazione degli acidi grassi del latte più significativi nel predire lo sviluppo di iperchetonemia.

Ulteriori studi, con un approccio clinico e terapeutico, saranno necessari in futuro per valutare se i valori di questi acidi grassi predittivi, cambiano in relazione a differenti diete o integrazioni alimentari e in relazione alla somministrazione di farmaci che possono prevenire l'insorgeza dell'iperchetonemia.



### 3. PREMESSA

Le malattie metaboliche sono una problematica molto ricorrente negli allevamenti di vacche da latte, così come negli ovini, durante la gravidanza. Nelle altre specie, allevate con finalità produttiva, la loro incidenza è sporadica e sicuramente meno impattante dal punto di vista economico.

Il mantenimento dell'omeostasi della bovina si basa sul corretto bilanciamento fra i nutrienti provenienti dalla dieta ed il consumo delle riserve corporee dovute alla produzione.

Le bovine da latte ad elevata produzione latte, molto spesso si trovano a dover far fronte a dei fabbisogni energetici e metabolici che non riescono ad essere soddisfatti dalla razione che è resa loro disponibile; questo accade, in particolar modo, durante il periodo del *peripartum* noto anche come periodo di transizione.

Durante questa fase, che si associa, per altro, ad un calo dell'ingestione, risulta essere difficile fornire una dieta sufficientemente concentrata dal punto di vista energetico e correttamente bilanciata nelle sue diverse componenti.

Questo squilibrio, a cui possono sopperire adeguatamente le riserve corporee in un'animale sano, se mantenuto per troppo tempo, può avere conseguenze deleterie sulla sua salute.

Un punto chiave, che si pone come prerogativa indispensabile per lo studio e la comprensione della fisiologia della bovina durante il periodo di transizione, è il metabolismo lipidico.

Squilibri che riguardano il metabolismo lipidico sono legati ad una elevata incidenza di diverse patologie che si riscontrano nel periodo di transizione.

L'obiettivo di questo progetto di tesi è stato quello di valutare il profilo lipidico del latte in relazione a due importanti indicatori dello stato fisiologico dell'animale e del bilancio energetico. Nella fattispecie sono stati impiegati i valori ematici di NEFA e BHB, che si relazionano con la mobilizzazione lipidica e la chetogenesi.



# **PARTE GENERALE**



#### 4. INTRODUZIONE

Definiamo come periodo di transizione, l'arco temporale che va dalle ultime 3 settimane di gestazione (corrispondente all'ultima fase del periodo di asciutta) alle prime 3 settimane di lattazione che seguono il parto (Grummer et al., 1995).

Tuttavia, risulta doveroso ricordare che questa definizione temporale si discosta rispetto a quella di altri autori (Simianer et al., 1991) che collocano il periodo di transizione fra le tre settimane antecedenti e le due settimane che susseguono al parto.

Durante questo periodo, le bovine sono sottoposte a drastici adattamenti per quanto riguarda il metabolismo del glucosio, acidi grassi e minerali. L'organismo deve far fronte alla crescita fetale e alla produzione di latte, oltre che al mantenimento dell'omeostasi (Overton et al., 2004).

Il periodo di transizione riveste un'importanza cruciale nel ciclo produttivo della bovina da latte; non esistono altre fasi che siano in grado di influenzare la produzione, la salute e le performance riproduttive in maniera così evidente. Da questo si può dedurre che il buon esito del periodo di transizione è in grado di determinare la redditività dell'animale in quella specifica lattazione (Constable et al., 2016).

In seguito al parto, la vacca deve far fronte ad un importante incremento dei propri fabbisogni nutrizionali, in coincidenza con una fase in cui diminuisce l'ingestione di sostanza secca (DMI-Dry Matter Intake) e le relative sostanze nutritive (Drackley, 1999).

Questa diminuzione del DMI tipicamente insorge durante l'ultima settimana che precede il parto. In concomitanza al cambiamento del profilo endocrino, la diminuzione dell'ingestione volontaria si correla con l'aumento degli acidi grassi non esterificati (NEFA-Non esterified fatty acid) presenti nel plasma (Constable et al., 2016).

L'aumento della concentrazione plasmatica dei NEFA è statisticamente associata ad un aumento dell'incidenza di malattie metaboliche legate ad una importante lipo-mobilizzazione, come la chetosi e la lipidosi epatica (Bertics et al., 1992).

L'incidenza di malattie metaboliche durante la fase di transizione determina una importante diminuzione della produzione lattea durante il periodo di malattia, che spesso perdura per tutta la durata della lattazione (Constable et al., 2016).

Altre complicazioni tra cui la ritenzione placentare, la dislocazione di abomaso ed una maggiore suscettibilità alle infezioni si possono correlare alla persistenza di un bilancio energetico negativo (NEB-Negative Energy Balance) nella vacca durante questa fase (Grummer et al., 2004).

Dal punto di vista riproduttivo, è noto che un prolungato periodo di bilancio energetico negativo NEB nel *peripartum*, determina una diminuzione delle performance riproduttive ed un conseguente allungamento dell'intervallo parto-concepimento. (Pushpakumara et al., 2003).

#### 4.1 CLASSIFICAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI

Gli acidi grassi sono suddivisi in acidi grassi saturi (Saturated Fatty Acid - SFA), quando non presentano doppi legami, ed acidi grassi insaturi (Unsaturated Fatty Acid - UFA), quando invece vi sono uno o più doppi legami. Gli UFA sono a loro volta possono essere suddivisi in FA monoenoici o monoinsaturi (Monounsaturated Fatty Acid - MUFA), costituiti da un unico doppio legame, e FA polienoici o polinsaturi (Polyunsaturated Fatty Acid - PUFA) quando il numero di doppi legami presenti nella catena acilica è uguale o superiore a due (Schwingshackl e Hoffmann, 2012).

In base alla configurazione geometrica assunta dagli atomi di idrogeno rispetto al doppio legame, gli acidi grassi insaturi sono classificati in due differenti configurazioni:

- configurazione *cis* se gli atomi di idrogeno sono entrambi nello stesso lato del doppio legame e la catena idrofobica quindi subisce un ripiegamento;
- configurazione *trans* se gli atomi di idrogeno si trovano su lati opposti rispetto al doppio legame e la catena idrofobica mantiene una configurazione rettilinea (Siliprandi e Tettamanti, 2014).

La conformazione *cis* è presente in natura, tuttavia la microflora batterica presente nel rumine attua processi di bioidrogenazione, modificando la configurazione in *trans*.

Una ulteriore classificazione degli acidi grassi insaturi può essere la seguente:

- Omega 3 ( $\omega$  3)
- Omega 6 ( $\omega$  6)
- Omega 7 ( $\omega$  7)
- Omega 9 ( $\omega$  9)

La quale prevede la suddivisione in quattro famiglie.

Questa suddivisione tiene in considerazione la posizione del primo doppio legame nella catena acilica rispetto alla porzione metilica (o terminale) della molecola. Gli acidi grassi appartenenti alla famiglia degli  $\omega$  7 e degli  $\omega$  9 sono considerati acidi grassi non essenziali. Queste famiglie di acidi grassi, possono essere sintetizzati dall'organismo a partire rispettivamente dal C16:0 e dal C18:0 (Panciroli, 2013). Vi sono poi degli acidi grassi essenziali appartenenti alla famiglia degli  $\omega$  3 ed  $\omega$  6,

definiti essenziali proprio perché devono essere assunti attraverso la dieta e non possono essere sintetizzati direttamente dall'organismo. Il precursore degli  $\omega 3$  è il C18:6 mentre, il precursore degli  $\omega 6$  è il C18:2 (Lunn e Theobald, 2006).

Una ulteriore classificazione degli acidi grassi proposta, si basa sul numero di carboni costituenti la catena idrocarburica:

- Short-Chain Fatty Acid (SCFA) con una catena carboniosa con un numero di atomi di carbonio non superiore a 4;
- Medium-Chain Fatty Acid (MCFA) con una catena carboniosa con numero di atomi di carbonio non superiore a 12;
- Long-Chain Fatty Acid (LCFA) con una catena carboniosa con numero di atomi di carbonio non superiore a 18;
- Very-Long-Chain Fatty Acid (VLCFA) con una catena carboniosa con numero di atomi di carbonio uguale o superiore a 20 (Agostini e Bruzzese, 1992).

Tabella 1. Legenda degli Acidi grassi considerati nella trattazione dell'elaborato.

PARAMETRO	NOMENCLATURA	PARAMETRO	NOMENCLATURA	PARAMETRO	NOMENCLATURA
Acidi Grassi a media catena		Acidi grassi a lunga catena		Acidi grassi a catena molto lunga	
<b>C6</b>	Caproic Acid / Acido Caproico	<b>C14</b>	Myristic Acid / Acido Miristico	<b>C20</b>	Arachidic Acid / Acido Arachidonico
<b>C8</b>	Caprylic Acid / Acido Caprilico	<b>C14:1<math>\omega</math>5</b>	Myristelaidic Acid / Acido Miristoleico	<b>C20:1<math>\omega</math>9</b>	Gondoic Acid / Acido Gondoico
<b>C10</b>	Capric Acid / Acido Caprico	<b>C16</b>	Palmitic Acid / Acido Palmitico	<b>C20:1<math>\omega</math>7</b>	Paullinic Acid / Acido Paullinico
<b>C12</b>	Lauric Acid / Acido Laurico	<b>C16:1<math>\omega</math>7</b>	Palmitoleic Acid / Acido Palmitoleico	<b>C20:2<math>\omega</math>6</b>	Eicosadienoic Acid / Acido Eicosadienoico
		<b>C17</b>	Margaric Acid / Acido Margarico	<b>C20:3<math>\omega</math>9</b>	Mead Acid / Acido Mead
		<b>C18</b>	Stearic Acid / Acido Stearico	<b>C20:3<math>\omega</math>6</b>	Dihomo- $\gamma$ -Linoleic Acid / Acido Diomo- $\gamma$ -linoleico
		<b>C18:1<math>\omega</math>9</b>	Oleic Acid / Acido Oleico	<b>C20:4<math>\omega</math>6</b>	Arachidonic Acid / Acido Arachidonico
		<b>C18:1<math>\omega</math>7</b>	cis-Vaccenic Acid / Acido Vaccenico	<b>C20:3<math>\omega</math>3</b>	Eicosatrienoic Acid / Acido Eicosatrienoico
		<b>C18:2<math>\omega</math>6</b>	Linoleic Acid / Acido Linoleico	<b>C20:4<math>\omega</math>3</b>	Eicosatetraenoic Acid / Acido Eicosatetraenoico
		<b>C18:3<math>\omega</math>6</b>	$\gamma$ -Linoleic Acid / Acido $\gamma$ -linoleico	<b>C20:5<math>\omega</math>3</b>	Eicosapentaenoic Acid / Acido Eicosapentaenoico
		<b>C18:3<math>\omega</math>3</b>	$\alpha$ -Linoleic Acid / Acido $\alpha$ -linoleico	<b>C22</b>	Behenic Acid / Acido Beenico
		<b>C18:4<math>\omega</math>3</b>	Stearidonic Acid / Acido Stearidonico	<b>C22:1<math>\omega</math>9</b>	Erucic Acid / Acido Erucico
		<b>C16DMA</b>	dimethylacetal-Palmitic Acid / Acido Palmitico Dimetilacetale	<b>C22:2<math>\omega</math>6</b>	Docosadienoic Acid / Acido Docosaesanoico
				<b>C22:4<math>\omega</math>6</b>	Adrenic Acid / Acido Adrenico
				<b>C22:5<math>\omega</math>3</b>	Decosapentanoic Acid (DPA) / Acido decosapentaenoico
				<b>C22:6<math>\omega</math>3</b>	Decosahexaenoic Acid (DHA) / Acido decosaesanoico
				<b>C23</b>	Tricosylic Acid / Acido Tricosilico
				<b>C24</b>	Lignoneic Acid / Acido Lignocerico
				<b>C24:1<math>\omega</math>9</b>	Nervonic Acid / Acido Nervonico

## 4.2 METABOLISMO LIPIDICO NEL BOVINO

L'inizio della lattazione aumenta in maniera esponenziale i fabbisogni energetici della bovina, determinando considerevoli cambiamenti, sia per quanto riguarda la richiesta di nutrienti provenienti dalla dieta e sia per quanto riguarda le funzioni metaboliche. Nelle bovine da latte, il fabbisogno energetico di inizio lattazione non è in genere soddisfatto dalla razione, comportando una mobilitazione di energia dalle riserve corporee. La mobilitazione dei lipidi dal tessuto adiposo, determina il rilascio di acidi grassi nel circolo ematico. Gli acidi grassi sono trasportati nel sangue sotto forma di diverse classi lipidiche che includono lipidi neutri (NL-Neutral lipids), fosfolipidi (PL-



phospholipids), e NEFA. La frazione dei NL è composta dai trigliceridi, digliceridi, monogliceridi, ed esteri del colesterolo. Sia i NL che i PL sono trasportati per mezzo di lipoproteine che includono very low density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL), e high density lipoprotein (HDL) la cui funzione è quella di mantenere questi lipidi in soluzione acquosa. (Contreras et al., 2010)

Al contrario, i NEFA sono tenuti in soluzione per mezzo della combinazione con le albumine, ad eccezione di una piccola frazione di NEFA che viene trasportata in circolo come monomero libero in soluzione col plasma (Richieri et al., 1995).

Per quanto riguarda gli acidi grassi in generale, possono essere utilizzati in quattro differenti modi nel fegato: possono essere secreti nella bile; ossidati completamente a CO<sub>2</sub>; ossidati parzialmente in acido acetico o corpi chetonici (Emery et al., 1992).

I SCFA (acidi grassi volatili e corpi chetonici) presenti nel fegato, derivano dal piccolo intestino dal quale sono trasportati attraverso la vena porta sotto forma di lipoproteine (principalmente come VLDL o chilomicroni) (Chilliard et al., 2000). Tuttavia, parte degli SCFA viene prodotta direttamente nel fegato attraverso il catabolismo dei LCFA (Hocquette e Bauchart, 1999).

La maggior parte dell'acido propionico viene convertito in glucosio a livello epatico. Il metabolismo epatico dell'acido butirrico produce acetil-coenzima A, acidi grassi a lunga catena, e corpi chetonici. In ogni caso, la produzione di corpi chetonici è più elevata quando sono disponibili acidi grassi liberi come substrato piuttosto che acido butirrico.

L'acido acetico, invece, non viene metabolizzato nel fegato se non in minima parte, rimanendo in larga parte disponibile per gli altri tessuti (Hocquette e Bauchart, 1999).

Parte dei LCFA disponibili a livello di circolo ematico deriva dall'idrolisi dei trigliceridi in circolo ad opera di specifici enzimi esterasi.

Il pool di LCFA presente nel fegato deriva principalmente dai NEFA presenti nel circolo ematico.

La concentrazione dei NEFA aumenta con la mobilizzazione lipidica dal tessuto adiposo (Hocquette e Bauchart, 1999).

I LCFA sono soggetti a reazioni di esterificazione ed ossidazione nel fegato. Durante l'esterificazione vengono prodotte molecole di trigliceridi, che possono essere stoccate nel citosol oppure trasportate dai microsomi alla membrana cellulare ed escrete sotto forma di VLDL. Per contro, nella reazione di ossidazione, gli acidi grassi vengono metabolizzati ad acetil-CoA all'interno dei perossisomi e mitocondri attraverso il ciclo di Krebs (Hocquette and Bauchart, 1999).

La ripartizione degli acidi grassi tra le due diverse vie metaboliche dipende in larga parte dalla razione (dal rapporto tra lipidi e carboidrati, il contenuto di grassi, e il profilo lipidico della razione)

e dal ruolo degli ormoni. Per esempio l'insulina stimola la liponeogenesi e l'esterificazione degli acidi grassi, ma ne inibisce l'ossidazione (Hocquette e Bauchart, 1999).

Una ripartizione non equilibrata, può portare all'accumulo di trigliceridi a livello epatico con conseguenti steatosi o chetosi clinica nel bovino (Hocquette e Bauchart, 1999).

Malgrado i ruminanti assumano prevalentemente LCFA saturi, possiedono alcune vie metaboliche specifiche che sono in grado di modificare la composizione degli acidi grassi presenti nei tessuti e negli organi. Per questo motivo è possibile riscontrare nella carne e nel latte di questi animali alcuni isomeri degli acidi grassi, tra cui i coniugati dell'acido linoleico, sebbene questi non fossero inizialmente presenti nella razione fornita (Brzozowska et al., 2016).

La composizione lipidica del latte è in larga parte determinata dal regime alimentare a cui l'animale è sottoposto, motivo per cui è possibile notare un cambiamento della stessa in relazione a modifiche dell'alimentazione (Jóźwik et al., 2010, Frelich et al., 2012, Kęsek et al., 2014).

I lipidi del latte derivano in larga parte dai trigliceridi che compongono le membrane cellulari, in una percentuale complessiva di 96-98% del grasso totale. La percentuale residuale è costituita da fosfolipidi, colesterolo ed esteri del colesterolo (Strzałkowska et al., 2009).

La classe dei trigliceridi comprende più di 400 acidi grassi, buona parte dei quali sono un prodotto intermedio del metabolismo lipidico che avviene nel rumine (Gunstone e Harwood, 2007).

Gli acidi grassi del latte possono essere sintetizzati *ex novo* a livello mammario, oppure vengono attinti dal circolo ematico. I substrati utilizzati per la sintesi *ex novo* sono l'acido acetico e il  $\beta$ -idrossibutirrato, che si formano durante la digestione della fibra a livello ruminale. Da questi, nelle cellule epiteliali vengono sintetizzati gli acidi grassi a corta e media catena (C4:0-C14:0) (tab.1), così come parte degli acidi grassi con 16 atomi di carbonio (circa il 50%) (Mansbridge e Blake, 1997; Sejrsen et al. 2007).

L'assorbimento degli acidi grassi da parte della ghiandola mammaria dal circolo ematico è una seconda importante fonte, che fornisce parte degli acidi grassi con 16 atomi di carbonio e tutti gli LCFA (Shingfield e Griinari, 2007).

Gli acidi grassi a lunga catena provenienti dal tessuto lipidico sono trasportati come NEFA, ed il loro uptake da parte della ghiandola mammaria è direttamente proporzionale alla loro concentrazione ematica (Mansbridge e Blake, 1997).

Il basso livello di PUFA nel latte, potrebbe essere spiegato dal fatto che questi sono molto concentrati nella frazione dei fosfolipidi e degli esteri del colesterolo presenti nelle HDL, il cui uptake da parte della ghiandola mammaria è molto basso (Mansbridge e Blake, 1997).

### 4.3 RUOLO E VARIABILITÀ DEGLI ACIDI GRASSI NEL LATTE

La quantità totale di lipidi presenti nel latte e la loro composizione dipende principalmente da due processi: il metabolismo lipidico a livello ruminale e quello che avviene a livello di ghiandola mammaria. Inoltre, gli acidi grassi immessi in circolo dalle riserve corporee durante il NEB di inizio lattazione, contribuiscono alla composizione finale del profilo lipidico del latte (Bernard et al., 2018). Gli acidi grassi nel latte si trovano prevalentemente legati al glicerolo formando le diverse molecole di trigliceridi. Il contenuto di acidi grassi liberi è molto limitato se questo non viene sottoposto a processi lipolitici od ossidativi, come quelli che si possono verificare nel caso di una mungitura o di un trasporto in condizioni non adeguate (Hanuš et al., 2008).

I principali acidi grassi presenti nel latte sono quelli di tipo monoinsaturo, con un'elevata presenza di acido oelico, e quelli di tipo saturo, tra cui i più presenti sono senza dubbio l'acido miristico, l'acido palmitico, e l'acido stearico. In proporzione i MUFA sono meno presenti e tra questi quelli che rivestono un ruolo preponderante sono l'acido linoleico, l'acido  $\alpha$ -linoleico (ALA) e i coniugati dell'acido  $\alpha$ -linoleico (CLA- conjugated linoleic acid) (Kalač P. e Samková E., 2010).

Il tratto digestivo ha una grande influenza sul destino degli acidi grassi provenienti dalla dieta. I SCFA vengono assorbiti attraverso le pareti del rumine o dell'abomaso. Gli MCFA vengono assorbiti attraverso le pareti intestinali, dove vengono incorporati all'interno di lipoproteine in grado di spostarsi all'interno del circolo linfatico e giungere infine al circolo ematico (Mansbridge e Blake, 1997; Bauman et al., 2006).

Recenti lavori hanno dimostrato come un cambiamento nel microbiota intestinale possa influenzare il profilo lipidico del latte. Questo cambiamento può essere determinato da una dieta con un elevato contenuto di amido (Shingfield et al., 2008), da una supplementazione con oli essenziali (Patra et al., 2012), da un cambiamento del rapporto tra foraggi e concentrati (Vlaeminck et al., 2006), dal passaggio da una alimentazione con tecnica unifeed o dalla messa al pascolo degli animali (De Menezes et al., 2011).

In quest'ultima tipologia di alimentazione possiamo riscontrare che, indipendentemente dalla composizione botanica del pascolo, il profilo lipidico del latte presenta un basso contenuto in C12:0, C14:0 e C16:0 (tab.1). Inoltre nello stesso latte possiamo trovare un'elevata percentuale di acido vaccenico (VA), acido rumenico (RA), C18:1 $\omega$ 9 ed altri acidi grassi mono insaturi (tab.1) (Samková et al., 2011).

L'utilizzo di semi oleaginosi all'interno della razione, rappresenta una strategia molto diffusa per migliorare il profilo lipidico del latte. I semi di soia e di colza costituiscono un'ottima fonte di energia e di proteine di elevata qualità; per questo motivo sono prodotti di largo impiego in molti paesi del mondo.

Tuttavia questi due prodotti differiscono per quanto riguarda il loro profilo lipidico, e determinano dei cambiamenti peculiari per quanto riguarda il contenuto in acidi grassi del latte (Hanuš O. et al., 2018). I semi di soia aumentano il contenuto in acido laurico (LA) e leggermente quello in ALA, e di conseguenza la proporzione di acidi grassi polinsaturi  $\omega 3$  e  $\omega 6$  rispetto al corrispondente prodotto della colza. Con questi ultimi invece, abbiamo un aumento della proporzione del RA e C18:1 $\omega 9$ , ed una concomitante diminuzione del C14:0 e C16:0 (tab.1) (Rutkowska et al., 2015).

Un altro fattore in grado di influenzare il profilo lipidico è la tipologia di allevamento: soprattutto confrontandone una di tipo biologico con una di tipo convenzionale.

La principale differenza tra queste tipologie di allevamento risiede nella tecnica di alimentazione che è prevalentemente costituita dal pascolo, una quota di foraggi insilati, e una porzione minore di concentrati (più bassa dei foraggi insilati) in quello di tipo biologico rispetto al sistema convenzionale (Hanuš et al., 2018).

Confrontando allevamenti di tipo convenzionale con allevamenti di tipo biologico si possono osservare differenze statisticamente significative per quanto riguarda la proporzione in PUFA e isomeri trans degli acidi grassi polinsaturi (TFA). Queste due classi lipidiche sono significativamente più alte nel latte proveniente da allevamenti di tipo biologico (Samková et al., 2011). Nello studio di (Chung et al., 2018) emerge in maniera statisticamente significativa che la porzione di C18:1 c9, ALA e LA è superiore nel latte proveniente da allevamenti di tipo biologico (tab.1).

Lo stadio di lattazione, così come il bilancio energetico delle bovine, hanno un impatto consistente sul profilo lipidico del latte. La funzionalità della mammella ha una priorità sul metabolismo, per questo motivo durante un periodo di NEB le risorse energetiche disponibili vengono destinate alla sintesi del latte per il sostentamento della prole (Useni et al., 2018).

Una utilizzazione delle riserve energetiche corporee durante questo periodo, influenza il contenuto di acidi grassi nel latte (Bauman et al., 2006).

I NEFA che vengono maggiormente rilasciati in circolo dalle riserve corporee sono C16:0, C18:0, e C18:1 $\omega 9$  (tab.1), di cui l'ultimo è il più abbondante (Leroy et al., 2005). La proporzione di questi acidi grassi, in relazione ai NEFA totali circolanti nel plasma, è di circa l'80% nella prima settimana di lattazione (Contreas et al., 2010).

L'elevato uptake di LCFA da parte della ghiandola mammaria influenza la sintesi ex novo di acidi grassi mediante l'inibizione dell'enzima dell'acetil-CoA carbossilasi.

Per questo motivo, gli acidi grassi saturi sono al livello più basso nella prima settimana post partum, incrementando la loro proporzione fino alla 12 settimana (in concomitanza con il miglioramento del bilancio energetico). D'altra parte gli acidi grassi monoinsaturi, rappresentati in larga parte dal C18:1  $\omega$ 9 (tab.1), diminuiscono in proporzione nello stesso arco temporale (Palmquist et al., 1993).

Essendo l'acido oleico il principale acido grasso contenuto nel tessuto adiposo, questo viene rilasciato in vaste proporzioni durante i periodi di NEB, attraverso la lipolisi. (Rukkamsuk et al., 2000)

Una concentrazione elevata di C18:1 $\omega$ 9 (tab.1) nel grasso del latte costituisce un buon indicatore del NEB, non soltanto nella fase iniziale della lattazione, ma anche in qualsiasi altro periodo in cui l'animale è anoressico o affetto da chetosi (Van Haelst et al., 2008).

Con il miglioramento del bilancio energetico che avviene con l'aumento dell'ingestione o con la diminuzione produttiva, il profilo lipidico del latte cambia in maniera pronunciata (Gross et al., 2011).

Una proporzione significativamente più alta di acidi grassi saturi, descritta intorno ai 150 giorni post partum, è stata associata con una fase più avanzata della lattazione, quando gli animali non si trovavano più in un periodo di NEB (Vranković et al., 2017).

Similmente, un livello più basso di acidi grassi monoinsaturi intorno ai 150 giorni post partum, si associa ad un buon bilancio energetico nella bovina in lattazione (Stádník et al., 2013).

#### **4.4 CALO DELL'INGESTIONE VOLONTARIA E NEB**

La diminuzione dell'ingestione non è una peculiarità della specie bovina, in quanto è stata riscontrata anche in molte altre specie. Tuttavia, ciò che rende unico nel suo genere questo evento nella vacca da latte è l'enorme stress produttivo e metabolico che accompagna la transizione dalla fase finale della gestazione alla fase iniziale della lattazione.

Il risultato di decenni di selezione genetica per aumentare la produzione di latte hanno avuto come risultato la nascita di animali in grado di produrre entro pochi giorni dal parto una quantità di latte dieci volte superiore alle finalità di sostentamento della prole.

Malgrado l'animale sia in grado di far fronte a questo incremento di fabbisogni nutrizionali mediante un aumento del DMI, questa risposta risulta essere dilazionata nel tempo e per questo motivo trascorre molti giorni con un NEB (Grummer et al., 2004).

Una concentrazione plasmatica elevata di NEFA è un indicatore affidabile del NEB descritto in letteratura da Bell (1995). Altri possibili marker del NEB sono un aumento della concentrazione ematica del  $\beta$ -idrossibutirrato (BHB) (Bell, 1995), una diminuzione della glicemia (Grum et al., 1996), una diminuzione dell'insulinemia e della concentrazione del insuline like growth factor-1 (IGF-1) (Butler, 2003), una diminuzione della concentrazione plasmatica di leptina (Block, 2001), lipidosi epatica causata dall'accumulo di Triacilglicerolo (TAG) nel fegato (Bertics et al., 1992), e una diminuzione del BCS (Oldick et al., 1999).

Sono state descritte e studiate diverse ragioni in grado di giustificare la diminuzione della ingestione di sostanza secca (DMI) (Ingvarlsen et al., 2000). Una possibile spiegazione potrebbe essere la diminuzione del volume ruminale dovuta alla concomitante crescita fetale (Forbes et al., 1977).

Tuttavia la crescita fetale avviene in maniera graduale nell'ultimo trimestre di gravidanza, mentre la diminuzione in DMI normalmente non è rilevabile se non pochi giorni prima del parto.

La capacità volumetrica del ruminale non subisce variazioni sostanziali durante la transizione dal periodo di asciutta alla lattazione, rendendo di fatto poco plausibile la relazione tra il calo dell'ingestione in concomitanza del parto e la crescita fetale (Park et al., 2001).

Se esiste una diminuzione del volume ruminale effettivo durante la gestazione è probabile che questa sia compensata da un fisiologico aumento della velocità di transizione delle ingesta dal comparto ruminale agli altri pre-stomaci (Gunter et al., 1990).

Altri studiosi hanno indicato tra le possibili cause del calo di DMI un cambiamento del profilo endocrino del bovino; in particolar modo l'aumento della concentrazione di ormoni steroidei nel plasma, tra cui gli estrogeni, in concomitanza con la fine della gestazione (Grummer et al., 1990) (Bremmer et al., 1999).

Ciononostante va sottolineato il fatto che devono essere chiamati in causa altri fattori tra cui la percentuale di massa grassa, gli ormoni corticosteroidi, le citochine, la leptina, l'insulina, i peptidi enterici e i neuropeptidi dal momento che la diminuzione del DMI avviene sensibilmente prima rispetto ad un aumento consistente della concentrazione di estrogeni nel plasma (Moorby et al., 2000).

Il management è un aspetto da tenere in considerazione al fine di prevenire il calo volontario dell'ingestione. È noto infatti che numero di parti può influenzare l'assunzione di sostanza secca nel periodo antecedente al parto. Le manze hanno una minore DMI rispetto alle pluripare se rapportato in percentuale al proprio peso corporeo, ma a differenza di queste hanno degli ulteriori fabbisogni nutrizionali richiesti per completare il processo di crescita. Questo richiederebbe la possibilità di

avere accesso ad una razione maggiormente concentrata dal punto di vista energetico e nutrizionale. Trova perciò giustificazione il fatto che le manze siano più frequentemente soggette ad intensi periodi di NEB, quando sono in gruppo con animali pluripari ed hanno a disposizione una uguale razione (Grummer et al., 2004).

Lo stato di nutrizione dell'animale, punteggiato secondo la scala internazionale del Body Condition Score (BCS), può influenzare l'assunzione volontaria della razione. Le bovine che presentano un eccessivo stato di nutrizione al termine della gestazione sono soggette ad una diminuzione del DMI più severo rispetto alle bovine che hanno uno stato di nutrizione discreto o moderato (Treacher et al., 1986).

La stimolazione sistema nervoso simpatico e la liberazione di catecolamine possono influenzare la mobilitazione dei NEFA dal tessuto adiposo dei ruminanti. Per questo motivo si rende necessario agire sullo stress ambientale al fine di ridurre la mobilitazione dei lipidi nelle vacche durante il periodo di transizione e ridurre di conseguenza il tasso d'incidenza delle malattie metaboliche. Gli animali maggiormente a rischio sono quelli sottoposti a stress da caldo, da freddo, privi di uno spazio adeguato in mangiatoia e con una condizione di stabulazione non adeguata (Gerloof, 2000).

Agendo su questi fattori, mediante modifiche strutturali e di gestione, è possibile ridurre il rischio di malattia e migliorare le performance produttive della mandria.

#### **4.5 IMMUNOSOPRESSIONE DURANTE IL PERIODO DI TRANSIZIONE**

Durante il periodo di transizione lo stato immunologico della bovina risulta essere compromesso e ciò può essere messo in correlazione con lo stato di nutrizione, e lo stato fisiologico dell'animale. L'eccessiva mobilitazione delle riserve di grasso corporeo, può portare ad una eccessiva perossidazione lipidica da parte del fegato con la conseguente produzione di radicali liberi, in quantità che possono superare la capacità del sistema antiossidante di riequilibrare l'equilibrio ossido-riduttivo (Turk et al., 2013). L'esito è un complessivo stress ossidativo e una diminuzione dell'efficienza immunitaria (Sordillo et al., 2009).

Esistono diversi studi che supportano il concetto che lo stress ossidativo incide negativamente sul sistema immunitario dell'ospite. Se si associa questa immunodeficienza ad un'eccessiva risposta infiammatoria, che si riscontra tipicamente in queste fasi, abbiamo un'aumentata suscettibilità delle bovine da latte a svariati problemi di salute. (Allison e Laven, 2000; Bernabucci et al., 2005; Castillo et al., 2005; Sordillo, 2005; Wilde, 2006).

Gli estrogeni e i glucocorticoidi sono agenti immunosoppressivi ed aumentano considerevolmente il livello plasmatico in prossimità del parto (Goff e Horst, 1997).

Per questo motivo è ragionevole pensare che l'aumento della concentrazione di cortisolo ed estrogeni nel plasma, osservato verso la fine della gestazione, sia l'agente causale dell'effetto immunosoppressivo osservato dopo il parto.

Altri nutrienti essenziali per il buon funzionamento del sistema immunitario, tra cui le vitamine A ed E, risultano essere spesso carenti per via della minore ingestione di sostanza secca anche se le razioni somministrate sono ben bilanciate (Simonew e Wondu, 2013).

Alterazioni dell'attività dei neutrofili e linfociti durante il *peripartum*, contribuiscono allo sviluppo di nuove infezioni che possono esitare in malattie molto frequentemente osservate quali mastiti e metriti (Oliver e Sordillo, 1988).

Può essere interessante sottolineare che anche nelle donne in gravidanza si può osservare questa diminuzione dell'efficienza della risposta immunitaria innata.

In particolar modo, nell'uomo, è stata messa in evidenza un'alterazione della risposta dell'attività antimicrobica mediata dai neutrofili durante la gravidanza (Crouch et al., 1995).

Queste osservazioni in campo umano, supportano l'idea di base che l'immunosoppressione durante la gestazione sia funzionale al mantenimento della gravidanza e che una eventuale rottura di questo meccanismo sia un fattore importante negli aborti spontanei (Vince et al., 2001).

Essendo parte del sistema immunitario innato, i neutrofili costituiscono una prima linea di difesa contro le infezioni e si pensa abbiano un ruolo cardine nell'effettiva *clearance* dei batteri dalla ghiandola mammaria delle vacche da latte (Smith, 2000; Zychlinsky et al., 2003, Paape et al., 2003). Le vacche portatrici asintomatiche di agenti patogeni quali *Mycobacterium Avium subspecie paratuberculosis* e *Samonellae* per molti anni, possono improvvisamente presentare una importante sintomatologia clinica dopo il parto, attribuibile ad un calo dell'efficienza delle cellule del sistema immunitario innato ed acquisito, che fino a quel momento erano riuscite a mantenere queste infezioni sotto controllo (Radostis et al., 2000).

Evidenze epidemiologiche mostrano che le bovine con ipocalcemia sono più soggette a contrarre infezioni (Curtis et al., 1983), e hanno in media un'aspettativa di vita più bassa rispetto alle altre bovine della mandria non soggette ad ipocalcemia (Duffield et al., 2005).

Recentemente alcuni autori hanno approfondito la relazione tra gli squilibri nel livello plasmatico del calcio e la diminuzione dell'efficienza dell'immunità cellulare (Kimura et al., 2006).



A corroborare ulteriormente la relazione tra ipocalcemia e squilibri immunitari si può portare un'altra evidenza sperimentale: esiste uno studio che dimostra che alcune bovine a cui erano state resecate chirurgicamente le mammelle, durante il periodo transizione, avevano un'incidenza di patologie infettive inferiore rispetto al gruppo di controllo (Goff e Kimura, 2002).

Questo essenzialmente si lega al fatto che il calcio è un fattore essenziale per l'attivazione ed il corretto funzionamento delle cellule del sistema immunitario. Esso, infatti, risulta implicato nella regolazione della replicazione cellulare, nella produzione di citochine, nell'espressione di recettori per le citochine ed in altre fondamentali funzioni legate alle cellule immunitarie (Partiseti et al., 1994; Allen et al., 1995; Carruthers et al., 1996, 2000).

Anche la disponibilità di vitamina D può influenzare il sistema immunitario attraverso due meccanismi distinti fra di loro. Il primo riguarda l'omeostasi del calcio nelle bovine durante il periodo di transizione. In prossimità al parto le bovine cominciano solitamente ad accusare una carenza di 25-idrossivitamina B3 a livello plasmatico, in concomitanza ad un maggiore output di calcio per ragioni produttive (Horst et al., 2005).

Il secondo meccanismo riguarda l'influenza sull'espressione genica delle cellule del sistema immunitario. Questo si verifica poiché le cellule del sistema immunitario prelevano dal circolo ematico la 25-idrossivitamina B3 convertendola nella forma 1,25-idrossivitamina D3, che a sua volta è in grado di legarsi ad un fattore di espressione nucleare, influenzando l'espressione di numerosi geni (Simonew e Wondu, 2013).

#### **4.6 PATOLOGIE RILEVANTI DURANTE IL PERIODO DI TRANSIZIONE**

Le concentrazioni plasmatiche di NEFA E BHB possono essere funzionali ad una valutazione del NEB nella bovina durante il periodo del *peripartum*. Questi due parametri sono rispettivamente indici della mobilitazione lipidica a partire dalle riserve corporee e dell'ossidazione degli acidi grassi non esterificati a livello epatico (Herdt, 2000).

La mobilitazione lipidica è un fenomeno che si riscontra fisiologicamente nelle bovine durante il periodo di transizione, tuttavia il suo perdurare nel tempo può avere delle ripercussioni negative sulla salute degli stessi animali. A questo proposito, la letteratura scientifica ci suggerisce di considerare NEFA e BHB in sede di valutazione clinica durante la fase di transizione (Duffield et al., 2009).

Prendendo in considerazione un gruppo di animali situati all'interno di una mandria, si possono fare dei ragionamenti inerenti al rischio effettivo di sviluppare malattie metaboliche correlato a questi due ultimi parametri. La pubblicazione di Oetzel (2004) dimostra che se all'interno di un allevamento il 10% degli animali, campionati a termine della gravidanza (tra i 2 e i 14 giorno antecedenti al parto), presenta concentrazioni di NEFA maggiori di 0,400 mEq/L, oppure, la stessa percentuale di animali campionati in lattazione (5-50 DMI) presenta concentrazioni di BHB maggiori di 1,400 mmol/L allora tale allevamento è da considerarsi a rischio.

In condizioni diverse dal NEB, la concentrazione plasmatica di NEFA nelle bovine da latte è inferiore a 0,2 mmol/l (Adewuyi, 2005).

Negli ultimi 2-4 giorni di gestazione il valore ematico di NEFA inizia ad aumentare fino ad una soglia che dovrebbe non eccedere i 0,29mEq/L, per non sfociare nel patologico. In seguito al parto, verso i 3 DIM, i NEFA solitamente raggiungono il loro picco massimo, che dovrebbe attestarsi intorno a dei valori non superiori a 0,56mEq/L (Ospina et al., 2010).

Ai fini diagnostici, il campionamento ematico si effettua in un intervallo compreso tra il settimo ed il decimo giorno antecedenti al parto. Il motivo risiede nel fatto che i NEFA possono aumentare anche due settimane prima del parto se la bovina è predisposta a sviluppare malattie metaboliche. Concentrazioni di NEFA superiori a 0,4 mEq/L indicano un aumentato rischio per patologie uterine e disordini metabolici (Quiroz-Rocha et al., 2009).

Entro le prime 5-6 settimane di lattazione, la concentrazione plasmatica di NEFA si stabilizza intorno un valore di 0,300 mEq/ L negli animali sani (Radloff et al., 1966).

Il profilo lipidico del latte può essere correlato con l'intensità con cui vengono mobilizzate le riserve corporee adipose. Una concentrazione di lipidi nel latte superiore al 4,8% è indicativo di un severo NEB, e di conseguenza di una elevata concentrazione ematica di NEFA (Bell, 1995).

Il BHB è descritto in letteratura come un indicatore affidabile del rischio di sviluppare in patologie metaboliche a cui deve far fronte la bovina nel post parto. Il suo valore soglia è di 10 mg/dl rilevato a livello ematico (Ospina et al., 2010).

A tal proposito, si può dire che l'aumento delle concentrazioni ematiche di NEFA, nel pre e post-parto, e di BHB, nel post-parto, sia correlato ad un incremento dello sviluppo di patologie metaboliche, ad una ridotta produzione lattea ed infine ad una limitata performance riproduttiva (Ospina et al., 2010).

Di seguito sono riportati le soglie di NEFA e BHB che incidono negativamente sullo stato di salute della bovina in transizione:

- NEFA in preparto (due settimane): > 0,29 mEq /L;
- NEFA in postparto (due settimane): > 0,56 mEq /L;
- BHB in postparto (due settimane): > 10 mg/dl (Ospina, 2010)

#### 4.6.1 COLLASSO PUERPERALE O SINDROME IPOCALCEMICA

Questa patologia risulta essere maggiormente frequente nel periodo di transizione, in particolar modo nelle fattrici multipare, nelle 48 ore che seguono il parto; meno frequentemente si verifica qualche settimana prima o dopo il parto (Constable et al., 2016).

Il livello di calcio ematico diminuisce durante gli ultimi giorni di gestazione a causa dell'output di calcio impiegato per la sintesi del colostro, e solitamente non ritorna su valori fisiologici se non dopo diversi giorni dopo il parto (Goff e Horst, 1997).

Con l'inizio della lattazione l'output di calcio dovuto a motivi produttivi diventa considerevole tanto da rendere difficile per l'organismo mantenere un livello di calcemia adeguato.

Il calcio perso dal pool extracellulare deve essere necessariamente rimpiazzato attraverso l'aumento dell'assorbimento intestinale ed il riassorbimento della matrice ossea (Constable et al., 2016).

A questo proposito esistono studi che hanno messo in evidenza un'variabilità di razza relativa al numero di recettori intestinali per la vitamina D<sub>3</sub>, implicata nella regolazione dell'assorbimento del calcio (Goff, 2014).

Singole bovine, ed in certi casi famiglie di bovine, risultano essere più suscettibili rispetto ad altre; le manifestazioni patologiche tendono a diventare ricorrenti nei parti successivi rispetto al primo evento.

Tuttavia l'ereditabilità per la predisposizione alla paresi puerperale ed ipocalcemia si sono dimostrate essere non significative in diversi studi che attestano alla stessa un valore 0%, 4% e 12,8% (DeGaris et al., 2009).

Casi sporadici avvengono a metà lattazione o addirittura verso la sua conclusione. Tali manifestazioni risultano essere molto spesso delle sequele della patologia, in bovine che ne erano già state colpite al momento del parto. Successivi affaticamenti o eventi stressanti, possono esacerbarare una condizione già di per sé molto precaria determinando delle ricadute, soprattutto durante la manifestazione estrale. Durante l'estro infatti, la depressione dell'appetito in concomitanza con l'aumento della concentrazione ematica degli estrogeni può costituire un fattore precipitante (Constable et al., 2016).

Anche il BCS può condizionare una maggiore incidenza di casi di paresi puerperale al momento del parto (Harris et al., 1981). Questo rischio è stato quantificato da alcuni studiosi essere di 3.3 volte maggiore per vacche con un BCS maggiore o uguale a 4 (Heuer et al., 1999).

La spiegazione più verosimile è che, nelle bovine che giungono al parto con un eccessivo BCS, ci sia una diminuzione dell'ingestione volontaria di alimento con conseguenti squilibri per quanto riguarda l'assunzione del calcio nel momento in cui esso è maggiormente carente (Rukkwamsuk et al., 1999).

La composizione della dieta rappresenta per altro un punto di fondamentale importanza nello sviluppo della patologia. Una dieta eccessivamente concentrata nel contenuto di calcio assorbibile dall'intestino, rispetto ai fabbisogni fisiologici di tarda gestazione (stimati essere dal NRC (1989) nel range da 33g/d a 43g/d), può essere un fattore predisponente alla patologia.

Proprio in ragione dell'eccessivo carico di calcio nella dieta nei confronti dei fabbisogni giornalieri, il suo assorbimento attivo dal tratto digestivo e la sua mobilitazione dalla matrice ossea diviene quiescente. Questi meccanismi richiedono diversi giorni per tornare alla piena efficienza, e riuscire a riequilibrare l'omeostasi che viene perturbata dall'inizio della lattazione (Constable et al., 2016).

Studi compiuti negli '60 e '70 mostrano che aumentando sperimentalmente la concentrazione cationica o diminuendo la concentrazione anionica nella dieta si ha una alcalinizzazione dell'organismo, mentre somministrando una dieta con una minore concentrazione cationica e una maggiore concentrazione anionica si ha una acidificazione dello stesso.

Si è inoltre dimostrato che una alcalinizzazione dell'organismo determina una maggiore incidenza della paresi puerperale, mentre un'acidificazione dell'organismo provoca una diminuzione dell'incidenza della patologia (Constable, 2014).

Essendo il potassio il catione quantitativamente più importante di una dieta standard per ruminanti, eccessivo carico dello stesso nelle ultime settimane di gestazione può essere determinante nello sviluppo dell'ipocalcemia (Constable et al., 2016).

Infine la deficienza di magnesio durante la tarda gestazione favorisce l'incidenza dell'ipocalcemia; perciò l'ipomagnesemia è considerata la maggiore causa predisponente dei collassi ipocalcemicici che avvengono in piena lattazione (Goff, 2014).

I due meccanismi attraverso i quali la carenza di magnesio può predisporre all'ipocalcemia sono un inadeguato rilascio di PTH e una diminuita sensibilità dei tessuti al PTH negli stati di ipomagnesemia (Goff, 2014).

Al di là della manifestazione clinica, si stima che fino al 50% delle fattrici multipare siano affette da una ipocalcemia subclinica, rilevabile con una concentrazione nel siero di calcio compresa tra 1.4 mmol/L e 2.0 mmol/L (Reinhardt et al., 2011).

Importanti squilibri che riguardano il livello ematico del calcio determinano l'impossibilità da parte dell'animale di alzarsi sui propri arti, poiché il calcio risulta essere essenziale nella trasmissione dell'impulso nervoso e nella contrazione muscolare (Goff, 2008).

La manifestazione clinica è caratterizzata da diversi segni clinici ingravescenti nel tempo, che ai fini della descrizione possono essere suddivisi in diversi stadi. I livelli sierici di calcio totale sono ridotti a 2.0 mmol/L, solitamente al di sotto di 1.2 mmol/L, e talvolta sono inferiori a 0,5 mmol/L. La riduzione può correlarsi con la gravità della sintomatologia, ma non sempre. Negli stadi meno avanzati si possono notare segni quali irrequietezza, fascicolazioni muscolari a livello di spalla e collo, cute fredda, anoressia, atonia ruminale caratterizzata da lieve tipanismo e passo incerto.

Fasi successive sono caratterizzate da profonda prostrazione e debolezza muscolare, ipotermia, pupille dilatate, battito cardiaco e polso debole, frequenza cardiaca in aumento, musello e feci asciutte. L'animale tipicamente si trova in decubito sternale con la testa appoggiata sul petto.

L'ultimo stadio è caratterizzato da decubito laterale, severo ottundimento del sensorio, grave timpanismo ruminale, battito cardiaco difficilmente auscultabile, tachicardia, collasso circolatorio, coma e morte (Constable et al., 2016).

Un'ipocalcemia meno pronunciata determina in ogni caso una riduzione dell'ingestione volontaria, una dismotilità intestinale, una riduzione delle performance produttive ed inoltre determina una maggiore suscettibilità allo sviluppo di malattie metaboliche ed a contrarre infezioni. (Goff, 2008)

L'ipocalcemia e l'ipocalcemia subclinica possono essere quindi considerati dei fattori predisponenti allo sviluppo di diverse patologie che sono in grado di ridurre in maniera significativa la produttività durante la successiva lattazione.

Si possono riscontrare dunque una diminuzione della motilità ruminale e abomasale aumentando il rischio di dislocazione abomasale. La minore ingestione volontaria aumenta la mobilitazione del grasso corporeo per far fronte agli aumentati fabbisogni energetici di inizio lattazione.

Inoltre la contrattilità di tutta la muscolatura liscia è compromessa, inclusa quella del muscolo sfintere del capezzolo responsabile della chiusura dell'orefizio del capezzolo dopo la mungitura, aumentato così il rischio di mastite (Kimura et al., 2006).

La somministrazione endovenosa di certi aminoglicosidi, in particolar modo neomicina, diidrostreptomicina, e gentamicina, possono provocare una riduzione del grado di ionizzazione del calcio sierico e una manifestazione clinica assimilabile alla paresi puerperale.

Per questo motivo si suggerisce cautela nella somministrazione di tali farmaci nelle bovine a fine gestazione (Constable et al., 2016).

#### **4.6.2 SINDROME DELLA VACCA TERRA**

Il termine *downer cow* apparve per la prima volta nella letteratura scientifica negli anni 50 ed era riferito alle vacche che presentavano lesioni muscolo-scheletriche, che erano troppo deboli o troppo malate per alzarsi e deambulare senza assistenza (Stull et al., 2007).

Più recentemente il termine è stato utilizzato per denotare bovine non in grado di deambulare ed in decubito da almeno 24 ore senza ragioni chiaramente identificate (Stull et al., 2007).

Una classificazione ulteriore proposta per le bovine affette da questa sindrome (DCS-downer cow syndrome) prevede la valutazione dello stato del sensorio. Nella prima classe troviamo vacche con uno stato del sensorio vigile che non sono in grado di deambulare autonomamente pur tuttavia riuscendo a mantenere un decubito sternale.

Le bovine in decubito ma con uno stato del sensorio vigile, si trovano nell'impossibilità di alzarsi e deambulare a causa di lesioni muscoloscheletriche oppure neurologiche. Le lesioni più rilevanti riguardano il nervo sciatico o il nervo otturatorio, secondarie a distocie al momento del parto, a fratture delle ossa lunghe o della pelvi, a lussazione d'anca, o lesioni muscolari come risultato di traumi primari o determinate da un decubito prolungato (Burton et al., 2009).

La seconda classe invece comprende vacche con un moderato o severo ottundimento dello stato del sensorio e incapaci di mantenere un decubito sternale (Burton et al., 2009).

Questa classe comprende degli animali con malattie sistemiche che affliggono lo stato mentale, così come accade per la paresi ipocalcémica, nella setticemia, ipovolemia, peritoniti diffuse, lipidosi epatiche gravi, o malattie neurologiche che affliggono il tronco encefalico o la corteccia cerebrale (Burton et al., 2009).

La malattia è molto comune nelle bovine da latte e avviene con maggiore frequenza nei primi due o tre giorni che seguono il parto, spesso come complicazione della paresi puerperale. Altre condizioni debilitanti che si possono associare ad un decubito prolungato includono forme cliniche acute di mastiti da coliformi, metrite settiche, e acidosi ruminali acute (Poulton, 2014).

In letteratura possiamo riscontrare che l'incidenza della sindrome della vacca a terra associata alla paresi ipocalcémica, è compresa all'interno di un range che va da 3.8% a 28.2% di tutti i casi presi in considerazione (Ménard et al. 2007).

Da quanto emerge dalla pubblicazione di Guyot e coautori (2017), il valore ematico di NEFA per le bovine affette da DCS nettamente superiore a 0,7 mmol/L, preso come riferimento (Van Widen, 2003), sia che si trovassero in fase di inizio lattazione e sia che fossero in tarda lattazione. Inoltre, non sono emerse differenze statisticamente significative per quanto riguarda il valore di BHB tra il gruppo di animali sani e il gruppo di animali affetti DCS. Proprio per questo motivo gli autori concludono affermando che probabilmente la chetosi subclinica non è la causa predisponente principale di questa patologia (Guyot et al., 2017).

Un decubito prolungato, indipendentemente dalla causa che inizialmente lo determina, ha come esito un'aumentata pressione su determinate aree anatomiche, che provoca una ischemia locale e disfunzioni neuromuscolari inficiandone la prognosi (Constable et al., 2016).

#### **4.6.3 CHETOSI BOVINA**

Un eccessivo stato di nutrizione nelle bovine durante il periodo di asciutta può esitare in un decremento dell'ingestione in seguito al parto. Di conseguenza le bovine, con un eccessivo BCS all'inizio della lattazione, incorrono in un periodo di NEB più severo rispetto alle altre. Durante il periodo di NEB i fabbisogni energetici della bovina sono soddisfatte attraverso la proteolisi e la lipolisi, la quale si associa ad un aumento della concentrazione dei NEFA nel plasma.

Nelle fasi produttive dell'immediato dopo parto, le bovine con un NEB particolarmente intenso non riescono a mantenere un fisiologico equilibrio tra i TG prodotti a livello epatico ed il trasporto degli stessi verso altri tessuti sotto forma di VLDL. Di conseguenza abbiamo una infiltrazione lipidica del fegato che può essere più o meno grave, e la manifestazione clinica della chetosi (Rukkwamsuk et al., 1999) (Herdt et al., 1981) (Herdt, 2000).

La causa più importante della chetosi bovina risiede nella limitata capacità da parte del fegato di ossidare completamente i NEFA, ciò conduce ad un aumento considerevole nella sintesi di corpi chetonici, riesterificazione, ed accumulo di TG a livello epatico (Murondoti et al., 2004) (Carlson et al., 2007) (Li et al., 2012) (Schaff et al., 2013).

I corpi chetonici vengono prodotti a livello epatico in risposta ad una ridotta disponibilità del glucosio. Malgrado i corpi chetonici siano sempre presenti a bassi livelli negli animali sani, alcune

modifiche a livello di dieta, e talune patologie possono incrementare i livelli di questi metaboliti (McPherson and McEneny, 2012).

I corpi chetonici sono importanti vettori del trasporto energetico verso i tessuti extraepatici, soprattutto nei periodi di anoressia, quando la glicemia è bassa (Fukao et al., 2014).

Evidenze scientifiche dimostrano che i corpi chetonici inibiscono la degradazione delle proteine e quindi la gluconeogenesi, inoltre, sono in grado di risparmiare glucosio inibendone l'utilizzo (Zarrin et al., 2013; Zarrin et al., 2014; Zarrin et al., 2017).

Altri studi dimostrano che possono inibire la lipolisi e funzionare come sistema di sicurezza, sostituendo in un certo grado l'ormone dell'insulina, in particolar modo in quelle situazioni in cui è particolarmente carente come nella chetosi primaria. Perciò, i corpi chetonici hanno importanti funzioni sia come substrati in grado di sostituire il glucosio in molti tessuti, compreso il sistema immunitario, sia come messaggeri nella regolazione del metabolismo energetico (Holtenius and Holtenius 1996; Zarrin et al., 2014).

Un basso rapporto fra insulina e glucagone può stimolare la lipolisi nei tessuti periferici e la chetogenesi a livello epatico. Le bovine ad inizio lattazione hanno un basso rapporto insulina:glucagone a causa della bassa disponibilità di glucosio a livello plasmatico e risiedono in uno stadio catabolico (Constable et al., 2016). La regolazione del metabolismo è indirettamente influenzata dalla concentrazione di somatotropina. La somatotropina stimola la produzione di latte ma al contempo aumenta la lipolisi (Constable et al., 2016).

La chetosi subclinica viene solitamente definita da una concentrazione ematica del BHB inferiore a 1.2 mmol/L (McArt et al., 2012).

Studi sul campo hanno dimostrato che la chetosi subclinica colpisce circa il 40% delle bovine della mandria ma l'incidenza può arrivare fino all'80% (McArt et al., 2013).

Sia il picco d'incidenza che la prevalenza della chetosi subclinica avvengono intorno ai 5 DIM con valori che si attestano intorno rispettivamente al 22% e al 29% (McArt et al., 2012). Mandrie, con più del 15-20% di prevalenza di capi con un elevato valore di NEFA e BHB nella precoce lattazione, hanno una maggiore predisposizione nello sviluppare patologie metaboliche (McArt et al., 2013; Raboisson et al., 2014).

Le bovine affette da chetosi subclinica, durante il periodo che va dai primi 3 fino a 5 DIM, sono 6.1 volte più predisposte allo sviluppo della dislocazione di abomaso rispetto alle bovine che risultano essere negative ai test di campo fino ai primi 6 DIM ed oltre. La positività ai test per la chetosi subclinica da 5 fino a 7 DIM si è dimostrata essere correlata ad una probabilità 4.5 volte più elevata



di essere riformate durante la stessa lattazione, ad una probabilità del 70% di concepire al primo tentativo inseminativo, e ad una diminuzione della produzione media di latte di 2,2 kg per i primi 30 giorni di lattazione, rispetto alle bovine con iperchetonemia dopo gli 8 DMI ed oltre.

Ogni 0.1 mmol/L di incremento di BHB al primo test positivo per la chetosi subclinica aumenta il rischio di sviluppare dislocazione di abomaso di un fattore di 1.1, aumenta il rischio di riforma del capo di un fattore di 1.4, e si associa ad un decremento della produzione latte di 0,5 kg/giorno per i primi 30 DMI. Queste evidenze suggeriscono che l'aumento del BHB a livello plasmatico, rilevato nei test sulle bovine ad inizio lattazione, è in grado di predire le performance produttive future degli animali (McArt et al., 2012).

Bovine affette da chetosi subclinica spesso mostrano un elevato contenuto di C18:1 cis-9 nel grasso del latte, che potenzialmente potrebbe correlarsi con una carenza dell'enzima acil-CoA deidrogenasi (van Haelst et al., 2008).

Quando la concentrazione ematica di BHB eccede il valore di 1,2 mmol/L si può definire la manifestazione patologica dell'animale come chetosi clinica; anche se molti animali possono non presentare alcuna evidente sintomatologia pur eccedendo questa soglia (McArt et al., 2012).

Da un punto di vista eziopatologico, ci sono due tipologie di disturbi metabolici nel quale può insorgere la chetosi.

La prima tipologia (Chetosi di tipo 1) è caratterizzata da ipoglicemia e ipoinsulinemia, e avviene generalmente dalle 3 alle 6 settimane dopo il parto nelle bovine ad elevata produzione, in cui i fabbisogni di glucosio eccedono le capacità di compensazione metabolica. Nella fattispecie, al fine di risparmiare le proteine endogene utilizzate nella gluconeogenesi, vengono prodotti corpi chetonici per soddisfare i fabbisogni energetici dei diversi tessuti dell'organismo.

La seconda tipologia (Chetosi di tipo 2) è caratterizzata da iperglicemia e iperinsulinemia, e avviene tipicamente nelle prime fasi della lattazione.

Un importante fattore eziologico è rappresentato dalla sovra-alimentazione durante il periodo di asciutta, la quale può comportare dei disturbi nell'adattamento ormonale del metabolismo al momento del parto, con l'aumento dei livelli plasmatici di insulina, glicemia e spesso un concomitante aumento della chetonemia (Holtenius e Holtenius, 1996).

L'insieme delle reazioni del metabolismo energetico prevedono l'ossidazione bilanciata di composti a catena carboniosa con 2 o 3 atomi di carbonio (C2 e C3). Durante le prime fasi della lattazione, il rapporto fra C2 e C3 è sbilanciato, a causa dell'elevata disponibilità di composti lipogenetici (C2) e

una bassa disponibilità di composti glicogenetici legata anche agli output energetici dovuti alla produzione del latte.

Risulta essere abbastanza chiaro il fatto che le fonti energetiche della dieta possono influenzare l'equilibrio del rapporto C2/C3, come si evince dallo studio delle variazioni delle concentrazioni plasmatiche di NEFA, BHB, e glucosio. È stato dimostrato che gli alimenti glicogenetici aumentano la glicemia e l'insulinemia e decrementano la concentrazione plasmatica di NEFA e BHB.

Gli alimenti lipogenetici aumentano la concentrazione di grasso nel latte, diminuendo in concomitanza la percentuale proteica (van Knegsel et al., 2005).

Nel caso di una dieta molto ricca di alimenti glucogenetici, si riduce la deaminazione e l'ossidazione degli aminoacidi glucogenetici. Per questo motivo fornire nella dieta un surplus di questi nutrienti può migliorare il bilancio energetico. Esistono, invece, delle evidenze ambigue per quanto riguarda l'utilizzo di alimenti lipogenetici per il miglioramento del bilancio energetico.

Inoltre, gli alimenti glicogenetici possono ridurre la severità delle manifestazioni patologiche della chetosi e della lipidosi epatica, ma aumenta l'incidenza della acidosi ruminale clinica e subclinica (van Knegsel et al., 2005).

#### **4.6.4 LIPIDOSI EPATICA**

La lipidosi epatica determina un peggioramento dello stato di salute della bovina da latte e le performance produttive e riproduttive.

L'infiltrazione lipidica del fegato è parte di una sindrome di mobilizzazione lipidica generale, che avviene nella prima fase di lattazione, specialmente nelle bovine ad alto valore produttivo. Il motivo risiede nel fatto che l'energia utilizzata per la produzione di latte non è compensata dalla dieta e perciò vengono utilizzate le riserve corporee per soddisfare i fabbisogni energetici (Bobe et al., 2004). La patologia si manifesta quando l'accumulo di TG nel fegato supera la capacità epatica di metabolizzarli attraverso le dinamiche ossidative, o di trasportarli verso altri tessuti sotto forma di lipoproteine. L'eziopatogenesi della lipidosi epatica include diversi meccanismi che possiamo catalogare in diverse classi. L'accumulo di acidi grassi nel fegato può avvenire in conseguenza ad una dieta particolarmente ricca in lipidi o ad una aumentata mobilizzazione di TG dal tessuto adiposo a causa dell'aumentato fabbisogno energetico in condizioni particolari (es. lattazione, anomalie endocrine).

L'accumulo lipidico intra-citoplasmatico può essere determinato da alterazioni che riguardano l'ossidazione degli acidi grassi a livello di epatocita.

Una dieta particolarmente ricca in carboidrati può esitare in una maggiore produzione di acidi grassi, e di conseguenza di trigliceridi che si accumulano a livello epatocitario.

Anche una maggiore esterificazione degli acidi grassi a trigliceridi per aumentare la concentrazione di glucosio ed insulina, possono stimolare la sintesi di trigliceridi a partire dal glucosio e dai chilomicroni provenienti dalla dieta.

La diminuzione della sintesi di apolipoproteine e di conseguenza di lipoproteine negli epatociti può determinare un accumulo TG a questo livello, anche a causa di tossine o farmaci (McGavin et al., 2007).

Le patologie che avvengono più comunemente nel immediato postparto e che predispongono la bovina all'infiltrazione lipidica includono la chetosi, la dislocazione abomasale sinistra, la mastite, la ritenzione degli involti fetali, la milk fever e la sindrome della vacca a terra.

A causa del deficit energetico, la bovina mobilita le riserve corporee per la produzione di latte e perde una parte consistente della propria massa corporea.

A differenza di quanto avviene nelle altre specie (ad esempio nella lipidosi felina), le bovine affette da steatosi epatica non presentano alcun segno di insufficienza epatica. Possono manifestare abbattimento e riduzione dell'appetito, ma molto più spesso si manifestano i segni clinici che caratterizzano le patologie metaboliche che possono manifestarsi in concomitanza con la steatosi.

In circa il 30% delle vacche ad alta produzione, l'infiltrazione lipidica è grave ed è associata ad effetti gravi ma reversibili nelle strutture e nelle funzioni epatiche (Bobe et al., 2004).

L'accumulo lipidico determina un aumento del volume del fegato, mentre il suo colore vira verso il giallastro. Nei casi di lipidosi più lieve i lipidi possono accumularsi nella regione centrolobulare, mentre nei casi estremamente gravi, l'intero fegato è coinvolto e aumenta considerevolmente di volume, con larga parte degli epatociti occupata da vacuoli lipidici.

Nella maggior parte dei casi il metabolismo può adattarsi ad un periodo di bilancio energetico negativo, attraverso meccanismi di adattamento metabolico. Se questi meccanismi falliscono, si sviluppa lipidosi epatica.

In condizioni fisiologiche, l'accumulo di lipidi a livello epatico aumenta a cominciare da poche settimane prima del parto, arriva ad un picco del 20% del volume epatocitario una settimana dopo il parto e torna a livelli sotto il 5% intorno alle 26 settimane dopo il parto.

La mobilizzazione lipidica inizia 2-3 settimane prima del parto e, dopo che questo è avvenuto, si assiste ad un grande aumento di accumulo di lipidi. La bassa capacità glucogenetica porta successivamente a bassa glicemia, bassi livelli di insulina e ad alte quote di mobilizzazione di acidi grassi, che causano una grave lipidosi epatica (Holtenius et al., 1990).

Le bovine con lipidosi epatica subclinica, l'elevata concentrazione di NEFA e glucosio nel plasma sono strettamente correlati alla presenza di trigliceridi nel fegato. Al contrario le bovine con un elevata concentrazione di TG epatici presentano solitamente dei valori plasmatici di glucosio e NEFA fuori dai range (Jorritsma et al.2004).

Quando lo squilibrio fra la capacità da parte del fegato di ossidare gli acidi grassi e la sua capacità di captazione arriva ad assumere entità importanti, inizia l'infiltrazione lipidica.

I lipidi in eccesso vengono stoccati come triacilglicerolo a livello epatico e vanno a diminuire la funzionalità dell'organo. I NEFA invece, vengono incorporati nel fegato e secreti come VLDL (very low density lipoproteins) o, in alternativa, vengono ossidati dai mitocondri e dai perossisomi. Nelle bovine, la sede principale di sintesi degli acidi grassi è il tessuto adiposo, non il fegato, per questo la loro capacità di secernere trigliceridi come lipoproteine è molto bassa se paragonata agli altri animali (Katon et al., 2002).

#### **4.6.5 RITENZIONE PLACENTARE**

La placenta viene rilasciata fisiologicamente durante la terza fase del parto. Il processo di rilascio della placente solitamente non supera le sei ore (Roberts, 1986). Se la ritenzione placentare nelle bovine si prolunga per più di 24 ore si arriva a definire questa condizione come patologica. La ritenzione placentare (ROP-Retention of Placenta) è una patologia che si riscontra nel 7% delle bovine in lattazione (Qu et al., 2014). L'incidenza della ROP aumenta del 25,9% in caso di aborto, del 16,4% nei casi in cui i nascituri nascano già morti e del 43,8% nei parti gemellari.

Esistono numerose cause che predispongono alla ritenzione degli invogli fetali. Tra queste vengono incluse cause di natura meccanica, nutrizionali, manageriali e di natura infettiva (Tucho e Ahmed W.M., 2017). Parti distocici, tagli cesarei, torsioni uterine ed aborti rientrano a far parte delle cause meccaniche della ROP. Le cause nutrizionali potrebbero essere correlate ad una deficienza proteica, vitaminica (vitamina A e vitamina E), di selenio, di iodio e di calcio durante il corso della gravidanza. Le cause manageriali includono la consanguineità all'interno dell'allevamento e l'eccessivo stato di nutrizione associato a condizioni particolarmente stressanti per l'animale durante la gestazione

(Joosten et al., 1991). Tra le infezioni note per essere fonte di problemi per l'apparato riproduttivo annoveriamo la salmonellosi, la leptospirosi, la brucellosi e la listeriosi (Grohn and Rajala-Schultz, 2000).

Secondo Kimura (2002), la ROP ha come importante fattore eziologico una diminuzione dell'efficienza da parte dei neutrofili a livello uterino. L'elevata concentrazione di BHB a livello plasmatico riduce la capacità dei neutrofili di sintetizzare radicali liberi (ROS-reactive oxygene species) e di conseguenza la loro efficienza immunitaria nei confronti degli agenti infettivi (Hammon et al. 2006).

Vi è infatti un aumento del rischio pari, al 5%, ogni volta che il colesterolo o gli acidi grassi mobilizzati nella settimana antecedente al parto subiscono un incremento di 0,1 mmol/L, questo a riprova del fatto che un eccessivo NEB nella bovina in transizione è correlato allo sviluppo di ROP (Quiroz-Rocha et al. 2009).

Le ricadute pratiche più comuni che si possono riscontrare in allevamento sono associate ad un calo della produzione latte e la diminuzione delle performance riproduttive, con un consistente aumento dell'intervallo parto concepimento (Laven e Peters, 1996).

#### **4.6.6 METRITE**

L'involuzione uterina, la rigenerazione uterina, il ritorno dell'attività ciclica ovarica, ed il controllo dei potenziali agenti patogeni a livello uterino sono dei prerequisiti fondamentali per il ritorno alla fertilità dopo aver partorito. Nelle bovine da latte ad elevata produzione spesso si riscontrano patologie uterine causate da batteri patogeni che insorgono nella fase successiva al parto.

Le malattie uterine nel post parto sono caratterizzate dall'isolamento di *Escherichia Coli*, *Trueperella pyogenes*, e batteri patogeni anaerobi (Sheldon e Owens, 2017).

Il riconoscimento dei batteri da parte del sistema immunitario innato, genera una importante risposta infiammatoria. L'infiammazione endometriale aumenta l'espressione delle proteine del complemento, delle interleuchine e delle proteine di fase acuta. La risposta infiammatoria aumenta il richiamo di neutrofili e macrofagi attraverso un meccanismo di chemotassi (Sheldon e Owens, 2017).

La ROP e le metriti sono positivamente correlate dal punto di vista statistico. Le vacche da latte con ROP hanno una incidenza significativamente più alta di metriti rispetto alle vacche che non ne sono

affette. Inoltre il tasso di concepimento per gli animali affetti da metriti e ROP è significativamente più basso (Youngquist e Threlfall, 2007).

L'esito della ROP è la ritenzione di tessuti placentari in decomposizione, i quali sono un substrato favorevole per la proliferazione batterica. I coliformi e l'elevata concentrazione di endotossine nelle lochiazioni delle bovine affette da ROP favoriscono la produzione di prostaglandine e citochine che inducono lo sviluppo di infezioni uterine (Dohmen, 2005).

Le metriti provocano una diminuzione del DMI, e di conseguenza, le multipare affette producono meno latte ad inizio lattazione rispetto agli animali sani. Questa differenza risulta essere particolarmente significativa nelle prime 20 settimane di gravidanza (Wittrock et al., 2011).

In seguito al parto, come già discusso in precedenza, le bovine si trovano in una condizione di grande stress metabolico, dovuto principalmente all'incapacità di assumere dalla dieta tutti i nutrienti necessari a soddisfare i propri fabbisogni. Diversi studi dimostrano che vi è una ridotta disponibilità di glucosio, glutammato e IGF-1 (Chagas et al., 2007; Kerestes et al., 2009).

Il NEB può alterare la risposta infiammatoria e la clearance batterica a livello endometriale, conducendo ad una endometrite cronica (Esposito et al., 2014).

Ciò è dovuto al fatto che la risposta che l'organismo deve mettere in atto per contenere la proliferazione di batteri patogeni a livello uterino è estremamente dispendiosa dal punto di vista energetico (Kvidera et al., 2017).

Valori di NEFA, nelle due settimane antecedenti al parto, superiori a 0,5mEq/L sono correlati all'instaurarsi di infezioni uterine a causa del loro effetto negativo sul sistema immunitario (Hammon et al., 2006). Infatti un'eccessiva mobilitazione lipidica a partire dalle riserve corporee aumenta il rischio di sviluppare malattie infiammatorie come appunto le metriti (Goff, 2006).

Inoltre, si è dimostrato sperimentalmente che la deplezione di nutrienti essenziali a livello cellulare, come il glucosio e glutamina, riducono l'efficienza della risposta infiammatoria a livello uterina. Anche gli acidi grassi sono potenti regolatori della risposta infiammatoria in quanto sono in grado di attivare la risposta immunitaria mediante il legame con il Toll-Like Receptor (TLR) presente nelle principali cellule coinvolte nella risposta immunitaria innata (Sordillo et al., 2009). Tra i principali acidi grassi che sono in grado di provocare il rilascio citochine di fase acuta (TNF, IL-1, IL-8), mediante il legame con il TLR, si annoverano i seguenti SFA: l'acido laurico, l'acido palmitico e l'acido stearico (Lee et al., 2001). Durante il periodo di transizione la composizione in SFA nelle membrane cellulari dei leucociti aumenta a scapito dei PUFA, diminuendo in tal modo la funzionalità delle cellule immunitarie (Contreras et al., 2010).

Di conseguenza se il livello di stress metabolica compromette la capacità dell'organismo di rispondere agli agenti patogeni, possiamo avere delle infezioni persistenti e delle infiammazioni croniche (Turner et al., 2016).

#### **4.6.7 DISLOCAZIONE DI ABOMASO**

La dislocazione di abomaso (DA-displacement abomasum) è una patologia caratterizzata dal riscontro clinico di una localizzazione anomala del viscere che si sposta nella porzione dorsale dell'addome, repleto di gas. Questa condizione può determinare una sintomatologia caratterizzata solitamente dalla presenza di anoressia, segni di dolore colico, calo della produzione latte, depressione, e in qualche caso si arriva al decesso dell'animale (Dirksen, 1962).

Il periodo maggiormente a rischio per lo sviluppo della patologia sono i primi 30 DIM, con un aumento dell'incidenza direttamente proporzionale all'aumento dell'età dell'animale (Constable, 1992). Altri autori riportano anche la prima lattazione come un periodo con un rischio relativo elevato. La causa potrebbe essere uno scarso adattamento dell'animale al nuovo regime alimentare e al cambiamento di gruppo sociale da parte delle primipare (Jubb et al., 1991). Un ridotto DMI nel periodo di transizione diminuisce notevolmente il volume occupato dal ruminante in cavità addominale ed inoltre vi sono innumerevoli disordini metabolici al parto come ipocalcemia e chetonemia che causano un ridotta motilità o atonia dell'abomaso (Behluli et al., 2017).

Numerosi studi evidenziano come la chetosi subclinica, caratterizzata da iperchetonemia ed ipoglicemia, sia un fattore di rischio per lo sviluppo di DA (Geishauser et al., 2000).

In concomitanza con l'aumento della glicemia e dell'insulinemia aumentano le secrezioni gastriche e la peristalsi gastro-intestinale; ma nell'animale in NEB questo non si verifica e per contro abbiamo un rallentamento di transito da parte delle ingesta e un accumulo di gas a livello abomasale (Van Winden et al., 2003).

Prendendo in considerazione il parametro NEFA, lo studio di Leblanc (2005) dimostra che una con una concentrazione ematica, nei sei giorni antecedenti al parto, uguale o superiore a 0,5 mEq/L aumenta il rischio di DA di 3,6 volte. Allo stesso modo, nel postparto (1-7 DIM) concentrazioni di BHB superiore a 1,2 mmol/L o di NEFA superiori a 1,0 mEq/L sono indici di elevato rischi di DA (LeBlanc, 2005). Anche il rapporto grasso-proteine presente nel latte (uguale o superiore a 1,4) ed il valore di BHB (uguale o superiore a 100 µmol/l), misurato sulla stessa matrice, si sono dimostrati essere degli indicatori relativi al rischio di DA (Geishauser et al., 2000).





## **PARTE SPERIMENTALE**



## 5. MATERIALI E METODI

I dati utilizzati per la stesura del presente elaborato fanno parte di un progetto di ricerca più ampio, che prevedeva l'arruolamento di 5 aziende di vacche da latte situate all'interno della Pianura Padana, nelle regioni del Veneto e Friuli Venezia Giulia.

Il progetto prevedeva la raccolta di campioni ematici, di latte, e dati anamnestici da bovine da latte di razza Frisona durante la prima fase di lattazione. Per ciascuna bovina è stato inoltre valutato il BCS, lo stato di salute e misurato il valore ematico di BHB sul campo.

Lo scopo del lavoro di ricerca era sulla valutazione del profilo lipidico del plasma e del latte da correlare con i parametri emato-biochimici e lo stato clinico dell'animale.

Una prima analisi, a livello aziendale, ci ha permesso di selezionare 54 animali che sono stati a loro volta suddivisi in 2 differenti gruppi in base al valore della loro chetonemia. La discriminante scelta per la costituzione dei due gruppi è stato il valore del BHB misurato direttamente sul campo e valutato in seguito in laboratorio. Il primo gruppo presentava un valore di BHB inferiore a 1,0 mmol/L ed era costituito da 33 unità, mentre nel secondo gruppo il valore di BHB eccedeva la concentrazione ematica di 1,0 mmol/L ed era costituita da 21 unità. Ulteriori analisi biochimiche, condotte in laboratorio, hanno permesso di suddividere gli stessi animali in altri 2 gruppi in base al valore dei NEFA. In questo caso, il primo gruppo era costituito da 33 unità e presentava un valore di NEFA inferiore a 0,5 mEq/L, mentre il secondo gruppo contava 21 unità con una concentrazione ematica di NEFA maggiore di 0,5 mEq/L. Queste valutazioni ci hanno permesso di suddividere la nostra popolazione campionaria in quattro distinti sottogruppi in base alle considerazioni fatti sul valore dei NEFA e BHB.

La raccolta dei dati è stata svolta a partire da settembre 2017 fino a febbraio 2018.

### 5.1 AZIENDA E ANIMALI

I campionamenti sono stati effettuati in un allevamento intensivo di bovine da latte, situato nel nord Italia (45°37' N; 11° 39' E) ad una altitudine di 45 m.s.l.m. Questa azienda era composta da 600 vacche in lattazione, di razza Frisona, con una produzione media di circa 10.000 kg di latte all'anno per animale.

La stalla era dotata di un sistema di stabulazione libera con cuccette provviste di materassino in lattice e corsie di alimentazione rivestite da tappetini di gomma. La gestione aziendale prevedeva la

suddivisione degli animali in lattazione in due gruppi, composti rispettivamente da pluripare e primipare, alimentate ad libitum con razioni identiche (vedi tab.1). Gli animali in asciutta erano alimentati con una dieta specifica; inoltre non era prevista nel piano alimentare una fase di steaming-up. La somministrazione della razione avveniva in due momenti distinti della giornata a distanza di 12 ore; la prima alle ore 4.30 e la seconda alle ore 16.30. Le bovine venivano munte 2 volte nell'arco della giornata in concomitanza con la somministrazione della razione.

Tutte le razioni erano somministrate secondo la tecnica TMR e ciascun animale poteva accedere in qualsiasi momento della giornata all'acqua per mezzo di abbeveratoi a vasca.

La politica di gestione aziendale prevedeva un periodo di asciutta di 2 mesi, e per quanto riguarda gli animali selezionati è stato riservato un periodo medio di asciutta di  $58 \pm 3$  giorni.

Il lavoro di campionamento è stato eseguito in un unico momento selezionando 54 animali che avevano un numero medio di parti di  $2.81 \pm 0,20$ , una media DIM di  $27,32 \pm 13,41$ , una produzione giornaliera media di latte di  $2,58 \pm 1,69$  kg (4,04 % di grasso e 3,65 % di proteine).

Lo stato di salute degli animali è stato valutato in base a visita clinica con esame obiettivo generale, rilevazione della temperatura corporea, frequenza respiratoria ed altri eventuali segni clinici.

La presenza di patologie in corso quali mastiti, ritenzioni placentari, dislocazioni di abomaso, ed altre eventuali, sono state la discriminante per escludere altre possibili bovine candidate allo studio; tuttavia non sono state rilevate in questa azienda.

*Tabella 2. Composizione chimica del TMR (total mixed ration) di bovine in lattazione ed in asciutta.*

Composizione chimica	%SS
UFL	0,96
CP	15,20
PD	12,11
PDIN	11,19
PDIE	11,32
PDIA	5,49
NDF	31,35
ADF	18,84
ADL	2,72
EE	4,60
ASH	7,35
ST	24,60
NSC	41,37
Ca	0,80
P	0,40

**LEGENDA:**

UFL: Unità Foraggiata Latte, Unité Fouragère Lait; CP: proteina grezza, Crude protein; PD: proteina digeribile, protein digestible; PDIN: proteina digeribile nell'intestino quando non vi è disponibilità di azoto per le fermentazioni ruminali, protein digested in the small intestine when rumen-fermentable nitrogen is limiting PDIE: proteine digerite nel piccolo intestino quando l'energia per le fermentazioni ruminali è limitata, protein digested in the small intestine when rumen-fermentable energy is limiting; PDIA: aminoacidi assorbiti nell'intestino provenienti dalle proteine alimentari non degradate nel rumine, dietary protein undegraded in the rumen but truly digestible in the small intestine; NDF: fibra neutra detergente, neutral detergent fiber; ADF: fibra acida detergente, acid detergent fiber; ADL: lignina acida detergente, acid detergent lignin; EE: etere estratto, ether extract; ASH: cenere, Ashes, ST: amido, Starch; NSC: carboidrati non-strutturali, non-structural carbohydrates; Ca: calcio, calcium; P: fosforo, phosphorus.

## 5.2 CAMPIONAMENTI EMATICI E VALUTAZIONE DELLA CHETONEMIA SUL CAMPO

Per eseguire i campionamenti ematici gli animali sono stati posti in cattura per consentire agli operatori di lavorare in condizioni di sicurezza.

Il prelievo di sangue è stato effettuato a distanza di circa 3 ore dalla somministrazione della razione (ore 7:00), dalla vena coccigea mediante un sistema Vacutainer utilizzando aghi monouso innestati su camicia. Per ciascun animale sono stati prelevati 9 ml in provette Venosafe con Clot Activator (Terumo Venosafe, Leuvel, Belgium).

Le provette con Clot Activator sono state trasportate in laboratorio, conservate ad una temperatura di 4°C e protette da possibili fonti luminose.

In concomitanza al prelievo un operatore valutava il valore di BHB mediante l'utilizzo di uno strumento di campo (Nova Biomedical®) dotato di strisce reattive (Stat Strip Express®), utilizzato anche in medicina umana per la valutazione della glicemia nei pazienti diabetici.

Il range di misura del BHB, permesso dallo strumento, è compreso tra 0,0 mmol/l e 8,0 mmol/l.

A partire dai 54 animali selezionati abbiamo cominciato a fare delle considerazioni in merito al valore rilevato di chetonemia rilevato attraverso le strisce reattive. Per questo motivo gli animali con un valore di BHB superiore a 1,0 mmol/L sono stati classificati come patologici, in quanto presentanti un valore di corpi chetonici nel sangue superiore ad una soglia classificata ad elevato rischio in letteratura scientifica (Ospina, 2010). Questa preliminare considerazione ci ha permesso di fare una prima suddivisione della nostra popolazione campionaria in due sottopopolazioni:

- 33 soggetti sani rientranti nel gruppo "BHB-0";
- 21 soggetti iperchetonemici rientranti nel gruppo "BHB-1";

Le successive analisi di laboratorio riguardanti il profilo lipidico degli stessi animali, ci hanno permesso di correlare questi parametri con la diversa presenza delle varie classi lipidiche e singoli acidi grassi all'interno del latte.

### **5.3 PRELIEVO DEI CAMPIONI DI LATTE**

Gli stessi animali sono stati in seguito campionati durante la mungitura del mattino, a 2 ore dalla distribuzione della razione, con l'intento di raccogliere almeno 40 ml totali di latte. Per il prelievo, l'operatore è stato munito di guanti monouso.

Per ridurre al minimo ogni potenziale rischio di contaminazione si è utilizzata una tecnica di prelievo standardizzata, che prevedeva prelievo di almeno 10 ml di latte da tutti i quarti. Si iniziava per ciascuna bovina con la pulizia dei capezzoli e disinfezione mediante pre-dipping, poi si procedeva con l'asciugatura con carta, e infine allo scarto dei primi getti di latte mediante mungitura manuale. Il latte è stato raccolto in delle provette Falcon che sono state in seguito mescolate e stoccate ad una temperatura di -20°C in attesa delle successive analisi.

Dal campione si sono ottenuti i dati inerenti a cellule somatiche (SCC Somatic Cell Count), percentuale di grasso (% Gr) e percentuale di proteine (% Prt).

### **5.4 VALUTAZIONE DEL *BODY CONDITION SCORE***

Di ogni animale è stata valutata la condizione corporea utilizzando il sistema di punteggio del *Body Condition Score* (BCS) elaborato da Edmonson et al. (1989).

Il BCS è una valutazione visiva e tattile attraverso cui è possibile stabilire lo stato nutrizionale, di ingrassamento e lo sviluppo delle masse muscolari degli animali, basandosi su una scala da 1 a 5. Il punteggio 1 corrisponde a uno stato di estrema magrezza ed emaciazione, mentre il punteggio 5 coincide con una condizione di eccessivo accumulo di massa grassa. Il punteggio può avere uno scarto minimo di 0,25 punti. I punteggi sono assegnati valutando i depositi adiposi in otto regioni del corpo: vengono osservate le prominente dei processi trasversi e spinosi delle vertebre lombari e la depressione tra i due, la profondità della fossa del fianco, il profilo tra ileo ed ischio e tra i due ilei, infine, gli accumuli di grasso presenti sulle tuberosità ischiatiche e nella regione della vulva (Edmondson et al. 1989).

## 5.5 ANALISI DI LABORATORIO

In laboratorio le provette con Clot Activator sono state centrifugate (Heraeus Labofuge 400, Thermo Scientific, Milano, Italia) a 3000 rpm per 10 minuti e si è provveduto a stoccare 2 aliquote di siero, in provette Eppendorf, per ogni soggetto e a mantenerle poi a -20°C per le successive analisi.

Il profilo biochimico è stato valutato tramite analizzatore automatico di chimica clinica (BT1500 Biotecnica instrument SPA, Roma, Italia) per quanto concerne i valori di BHB e NEFA.

Per ogni campione è stato valutato il valore del BHB (cinetica enzimatica, Randox, Milano, Italia) e NEFA (Metodo colorimetrico NEFA RX Monza test (kit no. FA 115, Randox, Crumlin, UK)).

Il valore di NEFA ottenuto in laboratorio ci ha consentito di fare una ulteriore suddivisione della nostra popolazione campionaria costituita da 54 animali. Basandoci sui dati presenti in alcune pubblicazioni di riferimento, tra cui quella di Opina (2010), abbiamo preso in considerazione il valore di NEFA > 0,5 mEq/L come indice di una eccessiva lipomobilizzazione da parte dell'animale con potenziali ricadute negative sul suo stato di salute.

Questo ci ha permesso di suddividere i campioni in due ulteriori gruppi:

- 33 soggetti sani facenti parte del gruppo "NEFA-0";
- 21 soggetti patologici facenti parte del gruppo "NEFA-1";

Come per i valori di BHB, i valori dei NEFA sono stati successivamente correlati al profilo lipidico del latte dei diversi soggetti presi in esame.

I campioni di latte sono stati preliminarmente sottoposti in sequenza a estrazione dei lipidi dal latte, separazione delle classi lipidiche mediante cromatografia su strato sottile (TLC - Thin Layer Chromatography) ed infine metilazione delle catene carboniose.

Prima di iniziare tali procedure, ciascun campione è stato addizionato con degli standard interni per ottenere dei valori di riferimento per le analisi.

L'estrazione dei lipidi dal latte è stata eseguita per mezzo di una miscela di solventi secondo il metodo di Folch. Le metodiche sono descritte nell'articolo di (Patterson et al. 2015) per l'estrazione delle diverse classi lipidiche dal latte. In tal modo è stato possibile eseguire il prelievo della componente organica contenente cloroformio, metanolo e la componente organica costituita dalle catene alifatiche di nostro interesse.

La frazione prelevata, è stata quindi posta in Heating Block, ossia in condizione di temperatura controllata a 40°C per 45 minuti per favorire l'evaporazione della fase liquida ed impedire la contaminazione con l'acqua che risulta essere particolarmente dannosa se iniettata all'interno della colonna gascromatografica, inficiando negativamente i risultati ottenuti.

Per ottenere la separazione delle diverse componenti lipidiche si è proceduto con una tecnica cromatografica bidimensionale secondo le metodiche descritte nella pubblicazione di (Santiago and Strobel 2013).

Inizialmente è stata preparata una vasca in vetro per cromatografia su cui abbiamo posto una soluzione in grado di costituire la fase mobile.

Ciascun campione è stato seminato linearmente su delle posizioni facilmente identificabili alla base della lastra cromatografica, in aliquote di 100µL. La separazione delle singole classi lipidiche, migrate ad altezze differenti dalla linea di deposizione, è stata generata per un diverso grado di affinità tra i composti presenti nel campione, la fase stazionari e la fase mobile.

L'intera corsa cromatografica richiedeva circa un'ora di tempo per far sì che la fase liquida raggiungesse il bordo superiore della lastra.

Al termine del processo, le diverse classi lipidiche si erano distribuite in delle posizioni univoche e caratteristiche all'interno della corsa cromatografica.

Una volta individuate visivamente le diverse classi lipidiche, abbiamo proceduto con il loro isolamento, semplicemente raschiando la silice dalla lastra in corrispondenza della macchie con l'ausilio di una lama da bisturi all'interno di provette di vetro precedentemente distinte con sigle univoche.

Le classi lipidiche isolate mediate tecnica TLC sono le seguenti:

- CE (esteri del colesterolo)
- PL (fosfolipidi)
- FFA (acidi grassi liberi)
- TG (trigliceridi)

Per procedere alla successiva fase di analisi delle varie frazioni lipidiche (da cui abbiamo escluso la classe dello stigmaterolo, in quanto chimicamente è una molecola che non lega alcun acido grasso metilabile), si è reso necessario un passaggio preliminare di conversione delle stesse in composti apolari ed a basso peso molecolare note come FAME (Fatty Acid Methil Esther). Tale processo viene appunto definito metilazione in quanto permette di ottenere degli esteri metilici facilmente identificabili e quantificabili con tecniche di gas cromatografia (GC).



La metodica si basa sulla letteratura scientifica, ed in particolar modo sulla descrizione che ritroviamo nella pubblicazione di Ichihara and Fukubayashi (2010).

Il processo si è concluso con il prelievo dei composti metilici, posti all'interno di provette vial precedentemente identificate con una sigla univoca, riportante il numero assegnato al bovino, la classe lipidica, l'azienda di provenienza e la data.

Una volta ottenuta la metilazione dei composti contenuti all'interno di ciascun campione, abbiamo potuto procedere alla successiva fase di analisi mediante gascromatografo (TRACE GC MS Thermo Quest, Milano, Italia).

Nel nostro caso abbiamo utilizzato delle colonne gascromatografiche capillari di materiale vitreo le cui pareti interne sono rivestite un composto apolare poroso, costituente la fase stazionaria (colonna cromatografica Omegawax 250).

La fase mobile è stata eluita per mezzo dell'elio, proprio per il suo basso peso molecolare e la sua scarsa propensione ad interagire con i composti chimici presenti.

La temperatura all'interno della camera termostatica è stata fatta variare da 60°C a 240°C, in funzione del fatto che la fase stazionaria apolare interagisce in maniera differente con gli esteri metilici presenti nel campione in funzione della temperatura.

La tecnica di rilevazione utilizzata è costituita dal Flame Ionization Detector (FID). La validità di questo metodo di rilevamento ed analisi è supportato dalla letteratura scientifica che ne attestano la capacità predittiva (Jorgesen et al., 1990).

Attraverso l'analisi del cromatogramma è stato possibile calcolare le aree sotto le curve (AUC), che rapportate alle effettive concentrazioni di IS, hanno consentito di ottenere le effettive concentrazioni di ciascun composto.

Le nostre valutazioni hanno tenuto in considerazione la composizione dei campioni per quattro diverse classi lipidiche (CE, PL, FFA, TG).

Per ciascuna classe lipidica è stato deciso di considerare la composizione nei diversi acidi grassi, valutata in mg/dL. Inoltre per ogni classe lipidica è stato possibile calcolare il valore totale degli acidi grassi presenti ed il valore totale delle singole molecole libere presenti per unità di volume, raffrontandole con le quantità e i volumi noti degli IS (mg/dL).

Gli acidi grassi da noi presi in considerazione per la successiva rielaborazione statistica dei dati i seguenti:

- C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C14:1 $\omega$ 5, C16:0, C16:1 $\omega$ 7, C17:0, C18:0, C18:1 $\omega$ 9, C18:2 $\omega$ 6, C18:3 $\omega$ 6, C18:3 $\omega$ 3, C20:2 $\omega$ 6, C20:3 $\omega$ 6, C20:4 $\omega$ 6, C20:3 $\omega$ 3, C20:5 $\omega$ 3, C22:0, C22:1 $\omega$ 9,

C22:2 $\omega$ 6, C22:4 $\omega$ 6, C22:5 $\omega$ 3, C22:6 $\omega$ 3, C23:0, C24:0, C24:1 $\omega$ 9 e C16 DMA per la classe lipidica dei CE.

- C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C14:1 $\omega$ 5, C16:0, C16:1 $\omega$ 7, C17:0, C18:0, C18:1 $\omega$ 9, C18:2 $\omega$ 6, C18:3 $\omega$ 6, C18:3 $\omega$ 3, C20, C20:1 $\omega$ 9, C20:2 $\omega$ 6, C20:3 $\omega$ 6, C20:4 $\omega$ 6, C20:3 $\omega$ 3, C20:5 $\omega$ 3, C22:0, C22:1 $\omega$ 9, C22:2 $\omega$ 6, C22:4 $\omega$ 6, C22:5 $\omega$ 3, C22:6 $\omega$ 3, C23:0, C24:0, C24:1 $\omega$ 9 e C16 DMA per la classe lipidica dei PL.
- C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C14:1 $\omega$ 5, C15, C16:0, C16:1 $\omega$ 7, C18:0, C18:1 $\omega$ 9, C18:2 $\omega$ 6, C18:3 $\omega$ 6, C18:3 $\omega$ 3, C20, C20:1 $\omega$ 9, C20:2 $\omega$ 6, C20:3 $\omega$ 9, C20:3 $\omega$ 6, C20:4 $\omega$ 6, C20:3 $\omega$ 3, C20:5 $\omega$ 3, C22:0, C22:1 $\omega$ 9, C22:2 $\omega$ 6, C22:4 $\omega$ 6, C22:5 $\omega$ 3, C22:6 $\omega$ 3, C23:0, C24:0, C24:1 $\omega$ 9 e C16 DMA per quanto riguarda la classe lipidica degli FFA.
- C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C14:1 $\omega$ 5, C16:0, C16:1 $\omega$ 7, C17:0, C18:0, C18:1 $\omega$ 7, C18:1 $\omega$ 9, C18:2 $\omega$ 6, C18:3 $\omega$ 6, C18:3 $\omega$ 3, C20, C20:1 $\omega$ 9, C20:2 $\omega$ 6, C20:3 $\omega$ 6, C20:4 $\omega$ 6, C20:3 $\omega$ 3, C20:5 $\omega$ 3, C22:0, C22:1 $\omega$ 9, C22:2 $\omega$ 6, C22:4 $\omega$ 6, C22:5 $\omega$ 3, C22:6 $\omega$ 3, C23:0, C24:0, C24:1 $\omega$ 9 e C16 DMA per la classe lipidica dei TG.

Le analisi di laboratorio sui campioni si sono svolte dal mese di ottobre 2017 al mese di ottobre 2018.

## 5.6 ANALISI STATISTICA

I dati ottenuti, dallo studio di ricerca, sono stati suddivisi mediante l'utilizzo software EXCEL. L'elaborazione statistica è stata effettuata mediante l'uso del software SAS sistem (versione 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

È stata effettuata l'analisi General Linear Model (GLM) per misure ripetute al fine di valutare le differenze sulla composizione degli acidi grassi del latte appartenenti alle quattro frazioni lipidiche, in base alle 2 classi di  $\beta$ -idrossibutirrato ematico (sano ed in iperchetonemia) e alle 2 classi di NEFA (sano ed in iperchetonemia).

Successivamente, è stato effettuato il Boruta test (effettuato mediante uso del software R2, Santa Monica, CA) per la selezione delle caratteristiche.

Infine, è stata effettuata un'analisi di curva ROC (Receiver Operating Characteristic) per stabilire il valore soglia (cut-off) per ogni acido grasso predittivo oltre il quale l'animale è considerato chetonemico in base ad analisi Boruta.

L'area sotto la curva AUC (area under the curve) esprime il potere diagnostico del test.

- $AUC = 0,5$  il test non è informativo,
- $0,5 < AUC \leq 0,7$  il test è poco accurato,
- $0,7 < AUC \leq 0,9$  il test è moderatamente accurato,
- $0,9 < AUC < 1,0$  il test è altamente accurato,
- $AUC = 1$  il test è perfetto.



## 6.RISULTATI

Nella tabella 3 sono riportati alcuni parametri produttivi dei 54 animali presi in esame. Nella prima metà sinistra della tabella, le bovine sono state suddivise in due gruppi secondo un criterio che considerava il valore cut-off di BHB a 1,0 mmol/L (Ospina et al., 2010).

Nella seconda metà a destra della tabella il criterio di suddivisione degli animali ha tenuto conto del valore cut-off di NEFA a 0,5 mEq/L (Ospina et al., 2010).

Per ciascun gruppo di animali sono riportati i valori medi  $\pm$  standard deviation ( $\pm$ SD) inerenti a BHB, NEFA, DIM, produzione latte giornaliera, BCS e numero parti. Per ogni classe di valori, sono stati messi in evidenza quelli per cui sussistevano delle differenze statisticamente significative tra il gruppo degli animali sani e quelli affetti da iperchetonemia o con una concentrazione plasmatica elevata di NEFA.

Tabella 3. Valore medio ( $\pm$  SD) di BHB, NEFA, DIM, BCS, numero di parti per capo e quantitativo di latte prodotto per capo.

	gruppo BHB 0	gruppo BHB 1	gruppo NEFA 0	gruppo NEFA 1
BHB (mmol/L)	0,52 $\pm$ 0,14	1,36 $\pm$ 0,15	0,92 $\pm$ 0,84	0,74 $\pm$ 0,26
NEFA (mEq/L)	0,48 $\pm$ 0,45	0,43 $\pm$ 0,32	0,23 $\pm$ 0,10	0,83 $\pm$ 0,43
DIM	30,16 $\pm$ 11,49	23,00 $\pm$ 15,19 <sup>A</sup>	28,34 $\pm$ 12,44	25,76 $\pm$ 14,96 <sup>A</sup>
BCS	2,86 $\pm$ 0,17	2,76 $\pm$ 0,22 <sup>A</sup>	2,75 $\pm$ 0,21	2,89 $\pm$ 0,15 <sup>A</sup>
n° parti	2,31 $\pm$ 1,49	3,63 $\pm$ 2,12	2,58 $\pm$ 1,86	2,57 $\pm$ 1,40
latte (kg/die)	30,53 $\pm$ 7,81	23,90 $\pm$ 4,78 <sup>A</sup>	28,40 $\pm$ 7,38	30,71 $\pm$ 8,43 <sup>A</sup>

A: differenza statisticamente significativa all'interno dei due gruppi BHB e NEFA con  $P < 0,001$

In tabella 4, sono evidenti le medie ( $\pm$  SD) degli acidi grassi costituenti le quattro differenti classi lipidiche presenti nel latte. Questi parametri sono stati utilizzati nello studio per valutare il trend degli acidi grassi nelle bovine in postparto, distinguendoli per le singole classi lipidiche.

Tabella 4. Valore medio ( $\pm$  SD) acidi grassi del latte presenti nelle quattro classi lipidiche. Valore espresso in mg/dl.

Parametro	Nomenclatura	PL	CE	FFA	TG
<b>Acidi grassi a catena media</b>					
<b>C6</b>	Acido Caproico	0,55 $\pm$ 0,87	1,61 $\pm$ 1,88	2,85 $\pm$ 3,54	29,96 $\pm$ 22,54
<b>C8</b>	Acido Caprilico	0,26 $\pm$ 0,64	0,91 $\pm$ 0,82	6,45 $\pm$ 5,23	27,97 $\pm$ 19,62
<b>C10</b>	Acido Caprico	0,84 $\pm$ 1,79	1,24 $\pm$ 0,91	7,37 $\pm$ 8,69	50,31 $\pm$ 35,10
<b>C12</b>	Acido Laurico	3,84 $\pm$ 9,21	3,99 $\pm$ 2,90	8,66 $\pm$ 6,04	42,15 $\pm$ 31,52
<b>Acidi grassi a lunga catena</b>					
<b>C14</b>	Acido Miristico	2,36 $\pm$ 4,24	1,29 $\pm$ 1,24	6,93 $\pm$ 6,90	90,22 $\pm$ 39,33
<b>C14:1<math>\omega</math>5</b>	Acido Miristoleico	0,10 $\pm$ 0,24	1,00 $\pm$ 2,88	0,21 $\pm$ 0,35	5,26 $\pm$ 3,76
<b>C16</b>	Acido Palmitico	7,14 $\pm$ 9,74	4,49 $\pm$ 5,91	23,52 $\pm$ 20,67	305,72 $\pm$ 134,08
<b>C16:1<math>\omega</math>7</b>	Acido Palmitoleico	0,14 $\pm$ 0,43	0,73 $\pm$ 1,32	0,20 $\pm$ 0,64	14,85 $\pm$ 10,86
<b>C17</b>	Acido Margarico	0,25 $\pm$ 0,34	0,39 $\pm$ 0,24	18,17 $\pm$ 0,82	7,03 $\pm$ 4,34
<b>C18</b>	Acido Stearico	3,92 $\pm$ 2,26	1,33 $\pm$ 0,94	6,03 $\pm$ 3,86	101,85 $\pm$ 69,02
<b>C18:1<math>\omega</math>9</b>	Acido Oleico	3,56 $\pm$ 6,39	0,87 $\pm$ 1,08	2,81 $\pm$ 6,05	246,68 $\pm$ 178,49
<b>C18:1<math>\omega</math>7</b>	Acido Vaccenico	/	/	/	13,91 $\pm$ 8,63
<b>C18:2<math>\omega</math>6</b>	Acido Linoleico	0,78 $\pm$ 0,97	0,30 $\pm$ 0,22	0,32 $\pm$ 0,78	27,16 $\pm$ 16,58
<b>C18:3<math>\omega</math>6</b>	Acido $\gamma$ -linoleico	0,04 $\pm$ 0,06	0,07 $\pm$ 0,15	0,09 $\pm$ 0,15	0,98 $\pm$ 0,60
<b>C18:3<math>\omega</math>3</b>	Acido $\alpha$ -linoleico	0,06 $\pm$ 0,12	0,16 $\pm$ 0,58	0,05 $\pm$ 0,23	4,12 $\pm$ 2,35
<b>C16DMA</b>	Acido Palmitico Dimetilacetale	1,20 $\pm$ 0,89	8,51 $\pm$ 2,03	2,22 $\pm$ 1,41	1,22 $\pm$ 1,06
<b>Acidi grassi catena molto lunga</b>					
<b>C20</b>	Acido Arachidonico	0,14 $\pm$ 0,11	/	0,08 $\pm$ 0,07	1,06 $\pm$ 0,98
<b>C20:1<math>\omega</math>9</b>	Acido Gondoico	0,04 $\pm$ 0,05	/	0,03 $\pm$ 0,07	0,93 $\pm$ 1,34
<b>C20:2<math>\omega</math>6</b>	Acido Paullinico	0,06 $\pm$ 0,22	0,12 $\pm$ 0,14	0,11 $\pm$ 0,13	0,46 $\pm$ 0,26
<b>C20:3<math>\omega</math>6</b>	Acido Eicosadienoico	0,14 $\pm$ 0,11	0,04 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,14	0,69 $\pm$ 0,46
<b>C20:4<math>\omega</math>6</b>	Acido Mead	0,12 $\pm$ 0,21	0,07 $\pm$ 0,16	0,06 $\pm$ 0,08	1,84 $\pm$ 1,43
<b>C20:3<math>\omega</math>3</b>	Acido Diomo- $\gamma$ -linoleico	0,02 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,31	0,02 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,11
<b>C20:5<math>\omega</math>3</b>	Acido Arachidonico	0,05 $\pm$ 0,11	0,11 $\pm$ 0,21	0,03 $\pm$ 0,06	1,71 $\pm$ 3,14
<b>C22</b>	Acido Eicosatrienoico	0,75 $\pm$ 0,67	0,03 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,14	0,29 $\pm$ 0,38
<b>C22:1<math>\omega</math>9</b>	Acido Eicosatetraenoico	0,02 $\pm$ 0,08	0,07 $\pm$ 0,12	0,02 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,08
<b>C22:2<math>\omega</math>6</b>	Acido Eicosapentaenoico	0,01 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,08	0,26 $\pm$ 0,60	0,02 $\pm$ 0,04
<b>C22:4<math>\omega</math>6</b>	Acido Beenico	0,10 $\pm$ 0,25	0,44 $\pm$ 0,76	0,11 $\pm$ 0,24	0,13 $\pm$ 0,23
<b>C22:5<math>\omega</math>3</b>	Acido Erucico	0,05 $\pm$ 0,12	0,06 $\pm$ 0,09	0,06 $\pm$ 0,18	0,41 $\pm$ 0,30
<b>C22:6<math>\omega</math>3</b>	Acido Docosaesanoico	0,09 $\pm$ 0,12	0,15 $\pm$ 0,23	0,21 $\pm$ 0,35	0,15 $\pm$ 0,21
<b>C23</b>	Acido Adrenico	0,33 $\pm$ 0,39	0,23 $\pm$ 0,27	0,29 $\pm$ 0,31	0,75 $\pm$ 0,97
<b>C24</b>	Acido decosapentaenoico	0,71 $\pm$ 0,42	0,12 $\pm$ 0,13	0,07 $\pm$ 0,05	0,12 $\pm$ 0,12
<b>C24:1<math>\omega</math>9</b>	Acido docosaesanoico	0,18 $\pm$ 0,88	0,04 $\pm$ 0,05	0,05 $\pm$ 0,06	0,16 $\pm$ 0,13
MgFa/dl	Milligrammi di acidi grassi liberi totali su decilitro	28,79 $\pm$ 36,76	29,02 $\pm$ 12,56	70,95 $\pm$ 56,53	978,57 $\pm$ 484,50
Mg/dl	Milligrammi di molecole totali su decilitro	40,87 $\pm$ 52,60	75,10 $\pm$ 32,80	70,95 $\pm$ 56,53	1023,23 $\pm$ 510,23

I nostri risultati, inerenti al profilo lipidico dei diversi gruppi di animali (BHB-0 vs BHB-1 e NEFA-0 vs NEFA-1), sono riportati nelle tabelle 5-8. Ciascuna tabella considera solamente gli acidi grassi appartenenti ad una specifica delle quattro classi lipidiche considerate (CE, PL, FFA, TG) ed assegna un valore P di significatività quando emerge una differenza statisticamente significativa tra i gruppi di animali confrontati.

Come si può osservare, in tabella 5 sono messi in evidenza i valori medi (con relativo SE) di ciascun acido grasso, appartenente alla classe lipidica dei CE, al variare del BHB e del NEFA ematico.

Considerando il valore del BHB, in questa classe lipidica sono risultati statisticamente significativi ( $p < 0,05$ ) i seguenti acidi grassi: C6, C8, C14, C18, C18:1 $\omega$ 9, C18:2 $\omega$ 6, C18:3 $\omega$ 6, C20:2 $\omega$ 6, C20:3 $\omega$ 6, C20:5 $\omega$ 3, C22, C22:1 $\omega$ 9, C22:2 $\omega$ 6, C22:4 $\omega$ 6, C22:5 $\omega$ 3, C23, C24.

Inoltre, risulta essere significativo il valore totale della classe dei CE; considerata sia come quantità di molecole totali per unità di volume (Mg/dl di CE) e sia come quantità di acidi grassi totali, legati alla molecola del colesterolo, per unità di volume (Mg FA/dl).

Al variare del valore ematico dei NEFA, sono risultati essere statisticamente significativi ( $p < 0,05$ ) gli acidi grassi C10, C22:5 $\omega$ 3.

Tabella 5. **Classe lipidica CE.** In seguito sono riportati i valori medi (espressi in mg/dL) di ciascun acido grasso appartenente alla classe BHB-0, BHB-1, NEFA-0 e NEFA-1 con relativi standard error (SE). Inoltre la tabella esprime, per ciascun parametro, un indice di significatività P ottenuto per mezzo dell'analisi della varianza tra classi.

<i>Parametro</i>	<b>BHB-0</b>	<b>SE<sub>BHB-0</sub></b>	<b>BHB-1</b>	<b>SE<sub>BHB-1</sub></b>	<b>P</b>	<b>NEFA-0</b>	<b>SE<sub>NEFA-0</sub></b>	<b>NEFA-1</b>	<b>SE<sub>NEFA-1</sub></b>	<b>P</b>
<b>C6</b>	2,37	0,27	0,02	0,40	<0,001	1,72	0,37	1,46	0,42	NS
<b>C8</b>	1,25	0,12	0,19	0,17	<0,001	0,99	0,16	0,80	0,18	NS
<b>C10</b>	1,32	0,16	1,08	0,24	NS	1,50	0,17	0,89	0,19	0,023
<b>C12</b>	4,51	0,51	2,92	0,73	NS	4,46	0,56	3,38	0,64	NS
<b>C14</b>	1,61	0,21	0,62	0,30	0,009	1,51	0,24	0,99	0,27	NS
<b>C14:1 ω 5</b>	1,27	0,52	0,43	0,75	NS	1,24	0,57	0,68	0,65	NS
<b>C16</b>	4,20	1,07	5,07	1,54	NS	3,56	1,15	5,70	1,31	NS
<b>C16:1 ω 7</b>	0,84	0,24	0,52	0,34	NS	0,78	0,26	0,68	0,30	NS
<b>C17</b>	0,44	0,04	0,30	0,06	NS	0,38	0,05	0,40	0,05	NS
<b>C18</b>	1,56	0,16	0,86	0,23	0,016	1,39	0,19	1,24	0,21	NS
<b>C18:1 ω 9</b>	1,06	0,19	0,47	0,27	0,05	0,88	0,21	0,85	0,25	NS
<b>C18:2 ω 6</b>	0,34	0,04	0,21	0,06	0,05	0,31	0,04	0,29	0,05	NS
<b>C18:3 ω 6</b>	0,05	0,03	0,13	0,04	0,05	0,06	0,03	0,09	0,03	NS
<b>C18:3 ω 3</b>	0,23	0,10	0,01	0,15	NS	0,18	0,12	0,14	0,13	NS
<b>C20:2 ω 6</b>	0,15	0,02	0,06	0,04	0,05	0,11	0,03	0,13	0,03	NS
<b>C20:3 ω 6</b>	0,05	0,01	0,01	0,01	0,002	0,04	0,01	0,03	0,01	NS
<b>C20:4 ω 6</b>	0,06	0,03	0,10	0,04	NS	0,09	0,03	0,05	0,04	NS
<b>C20:3 ω 3</b>	0,15	0,06	0,17	0,08	NS	0,18	0,06	0,12	0,07	NS
<b>C20:5 ω 3</b>	0,15	0,04	0,01	0,05	0,027	0,16	0,04	0,04	0,05	0,05
<b>C22</b>	0,04	0,005	0,004	0,007	<0,001	0,03	0,01	0,03	0,01	NS
<b>C22:1 ω 9</b>	0,09	0,02	0,02	0,03	0,05	0,09	0,02	0,04	0,03	NS
<b>C22:2 ω 6</b>	0,06	0,01	0,00	0,02	0,041	0,04	0,02	0,03	0,02	NS
<b>C22:4 ω 6</b>	0,64	0,13	0,002	0,19	0,008	0,36	0,15	0,53	0,17	NS
<b>C22:5 ω 3</b>	0,08	0,01	0,002	0,02	0,003	0,06	0,02	0,05	0,02	NS
<b>C22:6 ω 3</b>	0,13	0,04	0,17	0,06	NS	0,11	0,04	0,19	0,05	NS
<b>C23</b>	0,10	0,04	0,48	0,05	<0,001	0,19	0,05	0,28	0,06	NS
<b>C24</b>	0,16	0,02	0,05	0,03	0,05	0,13	0,03	0,11	0,03	NS
<b>C24:1 ω 9</b>	0,04	0,01	0,04	0,01	NS	0,04	0,01	0,05	0,01	NS
<b>C16 DMA</b>	8,75	0,36	8,02	0,52	NS	8,46	0,40	8,57	0,46	NS
<b>Mg FA/dl</b>	33,22	1,99	20,33	2,87	<0,001	30,07	2,48	27,65	2,83	NS
<b>Mg/dl</b>	86,86	5,09	50,80	7,31	<0,001	78,40	6,46	70,81	7,37	NS



Come si può osservare in tabella 6 sono messi in evidenza i valori medi (con relativo SE) di ciascun acido grasso, appartenente alla classe lipidica dei PL, al variare del BHB e del NEFA ematico.

Considerando il valore del BHB, in questa classe lipidica sono risultati statisticamente significativi ( $p < 0,05$ ) gli acidi grassi C20 e C24.

Al variare del valore ematico dei NEFA, è risultato essere statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) soltanto l'acido grasso C22:6 $\omega$ 3.

Tabella 6. **Classe lipidica PL**. In seguito sono riportati i valori medi (espressi in mg/dL) di ciascun acido grasso appartenente alla classe BHB-0, BHB-1, NEFA-0 e NEFA-1 con relativi standard error (SE). Inoltre la tabella esprime, per ciascun parametro, un indice di significatività P ottenuto per mezzo dell'analisi della varianza tra classi.

Parametro	BHB-0	SE <sub>BHB-0</sub>	BHB-1	SE <sub>BHB-1</sub>	P	NEFA-0	SE <sub>NEFA-0</sub>	NEFA-1	SE <sub>NEFA-1</sub>	P
C6	0,41	0,15	0,82	0,21	NS	0,40	0,16	0,80	0,20	NS
C8	0,36	0,11	0,07	0,16	NS	0,27	0,12	0,25	0,15	NS
C10	0,92	0,32	0,69	0,45	NS	1,04	0,33	0,52	0,42	NS
C12	5,18	1,61	1,17	2,28	NS	4,42	1,69	2,87	2,19	NS
C14	2,94	0,74	1,21	1,05	NS	2,68	0,78	1,83	1,01	NS
C14:1 $\omega$ 5	0,13	0,04	0,04	0,06	NS	0,12	0,04	0,07	0,06	NS
C16	7,97	1,73	5,48	2,44	NS	7,55	1,79	6,44	2,32	NS
C16:1 $\omega$ 7	0,16	0,08	0,11	0,11	NS	0,07	0,08	0,27	0,10	NS
C17	0,20	0,06	0,34	0,09	NS	0,27	0,06	0,21	0,08	NS
C18	3,85	0,40	4,06	0,57	NS	3,53	0,41	4,57	0,53	NS
C18:1 $\omega$ 9	3,52	1,14	3,63	1,61	NS	3,70	1,18	3,31	1,52	NS
C18:2 $\omega$ 6	0,65	0,17	1,06	0,24	NS	0,65	0,18	1,01	0,23	NS
C18:3 $\omega$ 6	0,04	0,01	0,03	0,02	NS	0,04	0,01	0,03	0,01	NS
C18:3 $\omega$ 3	0,07	0,02	0,03	0,03	NS	0,07	0,02	0,04	0,03	NS
C20	0,15	0,02	0,11	0,03	0,05	0,11	0,02	0,17	0,03	NS
C20:1 $\omega$ 9	0,05	0,01	0,03	0,01	NS	0,03	0,01	0,06	0,01	NS
C20:2 $\omega$ 6	0,08	0,04	0,02	0,06	NS	0,03	0,04	0,12	0,05	NS
C20:3 $\omega$ 6	0,13	0,02	0,16	0,03	NS	0,10	0,02	0,20	0,02	NS
C20:4 $\omega$ 6	0,14	0,04	0,09	0,05	NS	0,10	0,04	0,16	0,05	NS
C20:3 $\omega$ 3	0,02	0,002	0,01	0,004	NS	0,02	0,003	0,02	0,004	NS
C20:5 $\omega$ 3	0,05	0,02	0,05	0,03	NS	0,05	0,02	0,06	0,03	NS
C22	0,74	0,12	0,76	0,17	NS	0,66	0,12	0,90	0,16	NS
C22:1 $\omega$ 9	0,03	0,01	0,01	0,02	NS	0,03	0,01	0,01	0,02	NS
C22:2 $\omega$ 6	0,01	0,01	0,01	0,01	NS	0,01	0,01	0,01	0,01	NS
C22:4 $\omega$ 6	0,13	0,04	0,03	0,06	NS	0,12	0,05	0,06	0,06	NS
C22:5 $\omega$ 3	0,06	0,02	0,03	0,03	NS	0,03	0,02	0,07	0,03	NS
C22:6 $\omega$ 3	0,07	0,02	0,11	0,03	NS	0,06	0,02	0,13	0,03	0,05
C23	0,37	0,07	0,27	0,10	NS	0,28	0,07	0,42	0,09	NS
C24	0,59	0,07	0,94	0,10	0,006	0,64	0,08	0,82	0,10	NS
C24:1 $\omega$ 9	0,23	0,16	0,06	0,22	NS	0,24	0,16	0,07	0,21	NS
C16 DMA	1,28	0,16	1,04	0,22	NS	1,14	0,16	1,30	0,21	NS
Mg FA/dl	31,92	6,52	22,53	9,22	NS	29,47	6,78	27,66	8,76	NS
Mg/dl	45,43	9,33	31,75	13,19	NS	41,87	9,70	39,21	12,53	NS

Come si può osservare in tabella 7 sono messi in evidenza i valori medi (con relativo SE) di ciascun acido grasso, appartenente alla classe lipidica dei FFA, al variare del BHB e del NEFA ematico.

Considerando il valore del BHB, in questa classe lipidica sono risultati statisticamente significativi ( $p < 0,05$ ) i seguenti acidi grassi: C6, C22:1 $\omega$ 9, C22:2 $\omega$ 6, C22:5 $\omega$ 3, C22:6 $\omega$ 3.

Al variare del valore ematico dei NEFA, è risultato essere statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) solamente l'acido grasso C22:4 $\omega$ 6.

Tabella 7. **Classe lipidica FFA.** In seguito sono riportati i valori medi (espressi in mg/dL) di ciascun acido grasso appartenente alla classe BHB-0, BHB-1, NEFA-0 e NEFA-1 con relativi standard error (SE). Inoltre la tabella esprime, per ciascun parametro, un indice di significatività P ottenuto per mezzo dell'analisi della varianza tra classi.

Parametro	BHB-0	SE <sub>BHB-0</sub>	BHB-1	SE <sub>BHB-1</sub>	P	NEFA-0	SE <sub>NEFA-0</sub>	NEFA-1	SE <sub>NEFA-1</sub>	P
C6	1,11	0,44	6,83	0,66	<0,001	2,65	0,72	3,09	0,88	NS
C8	6,95	0,99	5,29	1,51	NS	6,92	1,07	5,75	1,32	NS
C10	8,38	1,64	4,99	2,50	NS	8,64	1,77	5,45	2,16	NS
C12	9,28	1,14	7,21	1,74	NS	9,25	1,24	7,77	1,52	NS
C14	7,34	1,32	5,96	2,01	NS	7,35	1,42	6,29	1,74	NS
C14:1 $\omega$ 5	0,24	0,07	0,13	0,10	NS	0,25	0,07	0,15	0,09	NS
C15	1,97	0,42	0,73	0,64	NS	1,92	0,46	1,12	0,56	NS
C16	24,91	3,94	20,29	6,01	NS	23,99	4,27	22,82	5,23	NS
C16:1 $\omega$ 7	0,20	0,12	0,20	0,19	NS	0,23	0,13	0,15	0,16	NS
C18	6,27	0,73	5,46	1,12	NS	6,15	0,80	5,85	0,98	NS
C18:1 $\omega$ 9	2,96	1,16	2,45	1,77	NS	3,16	1,25	2,29	1,53	NS
C18:2 $\omega$ 6	0,36	0,15	0,23	0,23	NS	0,38	0,16	0,23	0,20	NS
C18:3 $\omega$ 6	0,10	0,03	0,07	0,04	NS	0,11	0,03	0,06	0,04	NS
C18:3 $\omega$ 3	0,05	0,04	0,03	0,07	NS	0,07	0,05	0,01	0,06	NS
C20	0,08	0,01	0,07	0,02	NS	0,09	0,01	0,07	0,02	NS
C20:1 $\omega$ 9	0,03	0,01	0,02	0,02	NS	0,02	0,01	0,04	0,02	NS
C20:2 $\omega$ 6	0,11	0,03	0,10	0,04	NS	0,13	0,03	0,07	0,03	NS
C20:3 $\omega$ 6	0,14	0,03	0,08	0,04	NS	0,14	0,03	0,11	0,04	NS
C20:4 $\omega$ 6	0,05	0,02	0,07	0,02	NS	0,05	0,02	0,07	0,02	NS
C20:3 $\omega$ 3	0,02	0,01	0,02	0,01	NS	0,02	0,01	0,02	0,01	NS
C20:5 $\omega$ 3	0,04	0,01	0,02	0,02	NS	0,04	0,01	0,02	0,01	NS
C22	0,08	0,03	0,02	0,04	NS	0,07	0,03	0,05	0,03	NS
C22:1 $\omega$ 9	0,001	0,005	0,05	0,008	<0,001	0,02	0,01	0,01	0,01	NS
C22:2 $\omega$ 6	0,10	0,10	0,64	0,16	0,008	0,38	0,12	0,08	0,15	NS
C22:4 $\omega$ 6	0,14	0,05	0,02	0,07	NS	0,16	0,05	0,03	0,06	0,05
C22:5 $\omega$ 3	0,03	0,03	0,14	0,05	0,05	0,09	0,04	0,01	0,05	NS
C22:6 $\omega$ 3	0,14	0,06	0,37	0,10	0,05	0,21	0,07	0,21	0,09	NS
C23	0,32	0,06	0,20	0,09	NS	0,29	0,06	0,28	0,08	NS
C24	0,08	0,01	0,05	0,02	NS	0,08	0,01	0,06	0,01	NS
C24:1 $\omega$ 9	0,04	0,01	0,06	0,02	NS	0,05	0,01	0,04	0,01	NS
C16 DMA	2,36	0,27	1,87	0,41	NS	2,38	0,29	1,97	0,35	NS
Mg FA/dl	74,07	10,78	63,68	16,47	NS	75,43	11,63	64,23	14,25	NS
Mg/dl	74,07	10,78	63,68	16,47	NS	75,43	11,63	64,23	14,25	NS

Come si può osservare in tabella 8 sono messi in evidenza i valori medi (con relativo SE) di ciascun acido grasso, appartenente alla classe lipidica dei TG, al variare del BHB e del NEFA ematico.

Considerando il valore del BHB, in questa classe lipidica sono risultati statisticamente significativi ( $p < 0,05$ ) i seguenti acidi grassi: C6, C8, C10, C12, C14, C14:1 $\omega$ 5, C16, C16:1 $\omega$ 7, C17, C18, C18:1 $\omega$ 9, C18:2 $\omega$ 6, C18:3 $\omega$ 6, C20, C20:3 $\omega$ 6, C20:4 $\omega$ 6, C20:3 $\omega$ 3, C22, C22:4 $\omega$ 6, C24, C24:1 $\omega$ 9. Inoltre, risulta essere significativo il valore totale della classe dei TG; considerata sia come quantità di molecole totali per unità di volume (Mg/dl di TG) e sia come quantità di acidi grassi totali, legati alla molecola del colesterolo, per unità di volume (Mg FA/dl).

Al variare del valore ematico dei NEFA, sono risultati essere statisticamente significativi ( $p < 0,05$ ) i seguenti acidi grassi: C14:1 $\omega$ 5, C16, C16:1 $\omega$ 7, C17, C18:1 $\omega$ 9, C18:3 $\omega$ 3, C20:1 $\omega$ 9, C22, C22:4 $\omega$ 6.

Tabella 8. **Classe lipidica TG.** In seguito sono riportati i valori medi (espressi in mg/dL) di ciascun acido grasso appartenente alla classe BHB-0, BHB-1, NEFA-0 e NEFA-1 con relativi standard error (SE). Inoltre la tabella esprime, per ciascun parametro, un indice di significatività P ottenuto per mezzo dell'analisi della varianza tra classi.

<i>Parametro</i>	<b>BHB-0</b>	<b>SE<sub>BHB-0</sub></b>	<b>BHB-1</b>	<b>SE<sub>BHB-1</sub></b>	<b>P</b>	<b>NEFA-0</b>	<b>SE<sub>NEFA-0</sub></b>	<b>NEFA-1</b>	<b>SE<sub>NEFA-1</sub></b>	<b>P</b>
<i>C6</i>	24,22	3,99	39,77	5,21	0,022	29,21	4,30	31,13	5,37	NS
<i>C8</i>	23,71	3,53	35,25	4,61	0,05	28,26	3,75	27,53	4,67	NS
<i>C10</i>	43,35	6,36	62,17	8,31	0,05	51,70	6,70	48,13	8,36	NS
<i>C12</i>	35,13	5,66	54,14	7,39	0,047	39,09	5,98	46,92	7,46	NS
<i>C14</i>	82,61	7,14	103,19	9,33	0,05	92,19	7,50	87,16	9,36	NS
<i>C14:1 ω 5</i>	4,19	0,65	7,10	0,85	0,01	4,37	0,69	6,65	0,86	0,043
<i>C16</i>	259,81	22,46	384,05	29,33	0,002	275,82	24,59	352,24	30,67	0,05
<i>C16:1 ω 7</i>	11,88	1,90	19,90	2,49	0,014	11,73	1,93	19,70	2,41	0,013
<i>C17</i>	5,87	0,76	9,00	1,00	0,017	6,18	0,80	8,34	1,00	0,05
<i>C18</i>	81,56	11,94	136,48	15,60	0,008	96,57	13,13	110,07	16,37	NS
<i>C18:1 ω 9</i>	185,27	29,86	351,43	39,00	0,002	205,30	32,62	311,04	40,69	0,05
<i>C18:1 ω 7</i>	12,52	1,58	16,27	2,07	NS	13,26	1,64	14,91	2,05	NS
<i>C18:2 ω 6</i>	21,34	2,76	37,09	3,60	0,001	25,51	3,14	29,73	3,92	NS
<i>C18:3 ω 6</i>	0,81	0,10	1,28	0,14	0,01	0,96	0,11	1,03	0,14	NS
<i>C18:3 ω 3</i>	3,83	0,43	4,62	0,57	NS	3,64	0,43	4,88	0,54	0,05
<i>C20</i>	1,28	0,18	0,70	0,23	0,05	0,96	0,19	1,22	0,23	NS
<i>C20:1 ω 9</i>	0,81	0,25	1,13	0,33	NS	0,66	0,25	1,35	0,31	0,05
<i>C20:2 ω 6</i>	0,47	0,05	0,44	0,06	NS	0,45	0,05	0,48	0,06	NS
<i>C20:3 ω 6</i>	0,55	0,08	0,94	0,10	0,005	0,71	0,09	0,66	0,11	NS
<i>C20:4 ω 6</i>	1,28	0,23	2,79	0,30	<0,001	1,61	0,27	2,21	0,33	NS
<i>C20:3 ω 3</i>	0,07	0,02	0,19	0,02	<0,001	0,12	0,02	0,12	0,03	NS
<i>C20:5 ω 3</i>	1,73	0,59	1,69	0,77	NS	2,17	0,59	1,00	0,74	NS
<i>C22</i>	0,40	0,07	0,10	0,09	0,007	0,38	0,07	0,15	0,09	0,05
<i>C22:1 ω 9</i>	0,07	0,02	0,07	0,02	NS	0,07	0,02	0,07	0,02	NS
<i>C22:2 ω 6</i>	0,02	0,01	0,03	0,01	NS	0,02	0,01	0,03	0,01	NS
<i>C22:4 ω 6</i>	0,20	0,04	0,01	0,05	0,006	0,20	0,04	0,02	0,05	0,011
<i>C22:5 ω 3</i>	0,44	0,06	0,37	0,07	NS	0,39	0,06	0,45	0,07	NS
<i>C22:6 ω 3</i>	0,18	0,04	0,11	0,05	NS	0,19	0,04	0,11	0,05	NS
<i>C23</i>	0,75	0,18	0,75	0,24	NS	0,58	0,18	1,02	0,23	NS
<i>C24</i>	0,16	0,02	0,06	0,03	0,002	0,13	0,02	0,11	0,03	NS
<i>C24:1 ω 9</i>	0,13	0,02	0,21	0,03	0,035	0,16	0,02	0,15	0,03	NS
<i>C16 DMA</i>	1,35	0,20	0,98	0,26	NS	1,25	0,20	1,16	0,25	NS
<i>Mg FA/dl</i>	806,14	80,31	1272,73	104,89	<0,001	893,98	90,32	1110,17	112,65	NS
<i>Mg/dl</i>	850,61	84,57	1342,04	110,46	<0,001	943,37	95,13	1170,45	118,65	NS

Mediante l'utilizzo del test di Boruta, alcuni valori significativi precedentemente selezionati, sono stati confermati. Il test ha permesso, inoltre, di ridurre il numero dei parametri predittivi preso in considerazione sia al variare del BHB, sia al variare della concentrazione dei NEFA a livello ematico. I parametri predittivi sono riportati nel box plot della Figura 1 per quanto concerne il BHB e nella Figura 2 per i NEFA. La loro funzione predittiva, correlata alla disposizione nel grafico, aumenta spostandosi dal margine sinistro al destro (Figura 1-2).

Per rendere più fruibile la lettura del grafico si utilizza anche un codice colore. Partendo dal margine sinistro sono visualizzati gli acidi grassi senza valore predittivo (rosso) fino a raggiungere l'estremo destro del grafico dove sono riportati gli acidi grassi con il maggior valore predittivo (verde). Infine, in giallo sono riportati gli acidi grassi con funzione predittiva intermedia.

In tabella 9 sono riportati anche i criteri decisionali impiegati dal software e il valore di predittività stabilito con il Boruta test.

Figura 1. Box plot del Boruta Test relativo ai parametri predittivi del valore di BHB. Sono riportati graficamente nell'ingrandimento a destra parametri dotati da maggior valore predittivo (in verde).

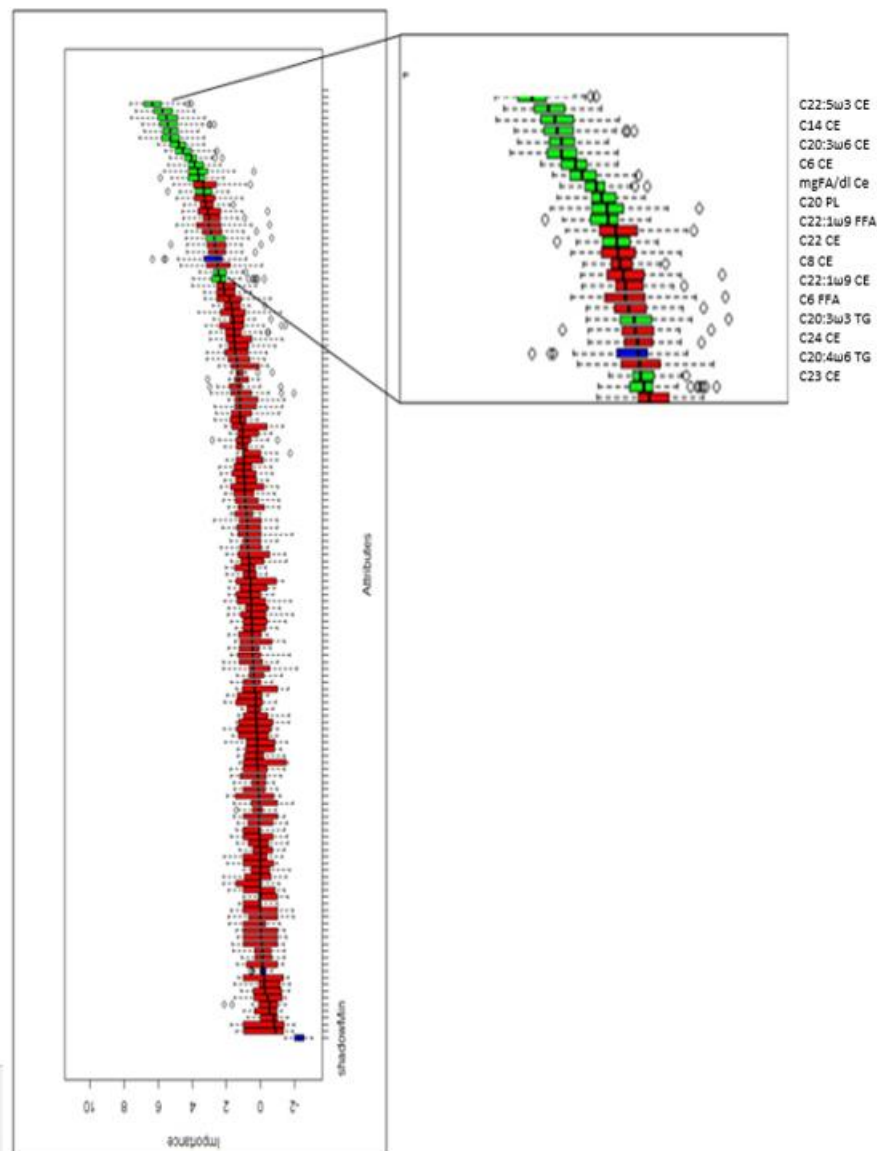


Tabella 9. Criteri decisionali impiegati dal software e il valore di predittività stabilito con il Boruta test per i parametri predittivi sul BHB.

<b>Variabile</b>	<b>meanImp</b>	<b>medianImp</b>	<b>MinImp</b>	<b>maxImp</b>	<b>normHits</b>	<b>Decision</b>
C22:5 $\omega$ 3 CE	6,276501	6,342163	4,064102	7,644981	1	Confirmed
C14 CE	5,324754	5,433324	2,698668	6,944374	0,989899	Confirmed
C20:3 $\omega$ 6 CE	5,270944	5,280532	3,286346	7,130381	0,979798	Confirmed
C6 CE	5,246128	5,285109	3,638441	6,8464	0,969697	Confirmed
mgFA/dl CE	5,402827	5,515284	3,237136	7,606404	0,969697	Confirmed
C20 PL	5,712597	5,77309	3,860111	7,335532	0,969697	Confirmed
C22:1 $\omega$ 9 FFA	4,803572	4,806646	3,271954	6,026996	0,969697	Confirmed
C22 CE	4,486317	4,568403	2,560238	5,603145	0,919192	Confirmed
C8 CE	4,055142	4,052023	2,255045	5,336618	0,909091	Confirmed
C22:1 $\omega$ 9 CE	3,79757	3,856949	2,313549	5,438566	0,808081	Confirmed
C6 FFA	3,706317	3,628643	2,137713	5,895956	0,808081	Confirmed
C20:3 $\omega$ 3 TG	3,62079	3,670846	0,373162	5,691727	0,787879	Confirmed
C24 CE	3,365562	3,336409	1,857136	5,466297	0,646465	Confirmed
C20:4 $\omega$ 6 TG	2,599632	2,704444	-0,67026	4,408475	0,434343	Confirmed
C23 CE	2,358941	2,369773	-0,23635	3,988874	0,40404	Confirmed

MeanImp= media del valore di importanza; medianImp = mediana del valore di importanza; minImp = minimo del valore di importanza; maxImp = massimo del valore di importanza; decision = esito decisionale del test di Boruta.

I parametri predittivi per lo stato di iperchetonemia (BHB>1,0 mmol/L), selezionati mediante il Boruta Test sono stati:

- C6, C8, C14, C20:3 $\omega$ 6, C20:5 $\omega$ 3, C22, C22:1 $\omega$ 9, C22:5 $\omega$ 3, C23, C24 e mgFA/dl appartenenti alla frazione lipidica degli esteri del colesterolo.
- C6 e C22:1 $\omega$ 9 appartenenti alla frazione lipidica degli acidi grassi liberi.
- C20 appartenente alla frazione lipidica dei fosfolipidi.
- C20:3 $\omega$ 3 e C20:4 $\omega$ 6 appartenenti alla frazione lipidica dei trigliceridi.

Figura 2. Box plot del Boruta Test relativo ai parametri predittivi del valore dei NEFA. Sono riportati graficamente nell'ingrandimento a destra parametri dotati da maggior valore predittivo (in verde).

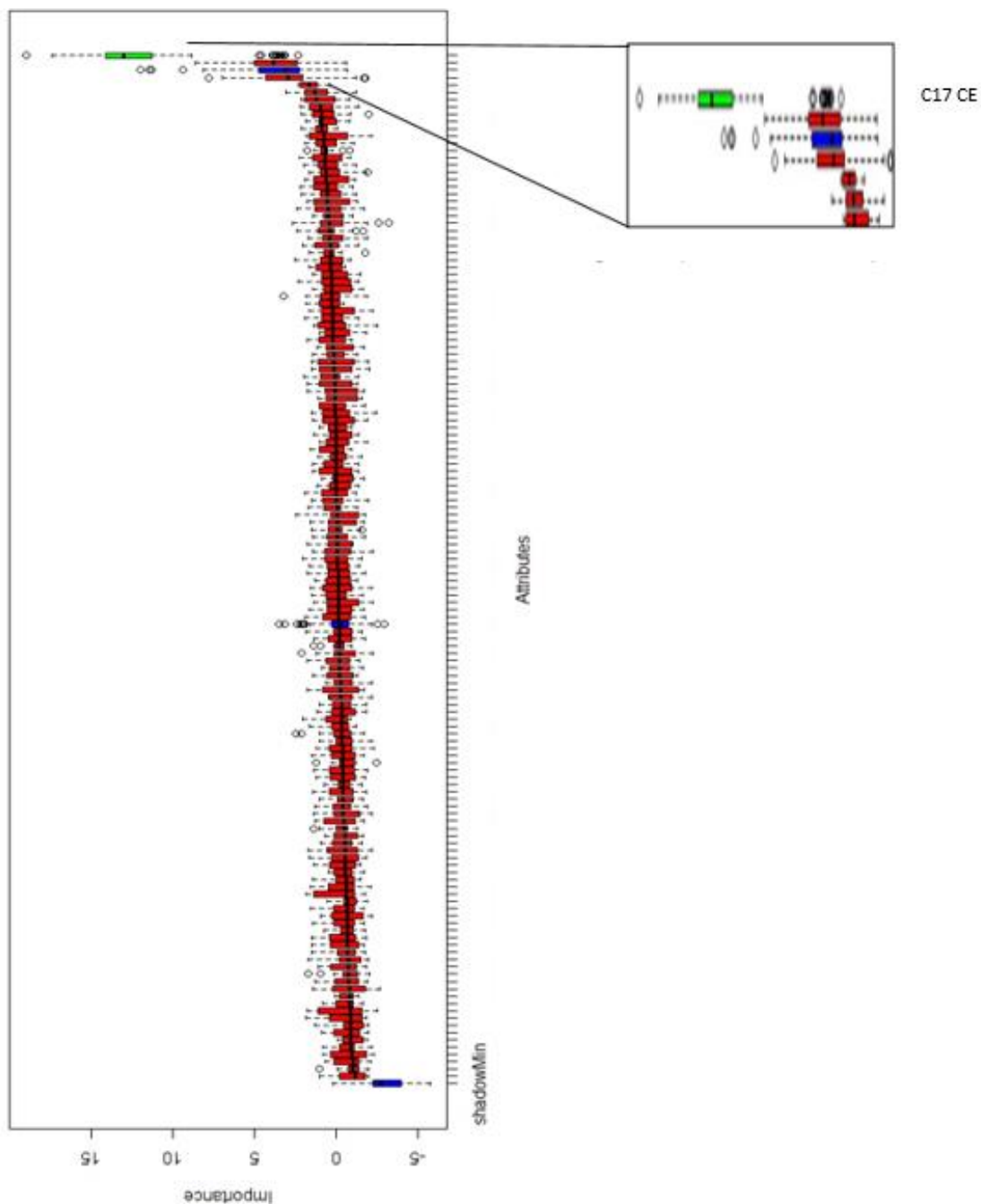


Tabella 10. Criteri decisionali impiegati dal software e il valore di predittività stabilito con il Boruta test per i parametri predittivi sui NEFA.

<b>Variable</b>	<b>meanImp</b>	<b>MedianImp</b>	<b>MinImp</b>	<b>MaxImp</b>	<b>normHits</b>	<b>Decision</b>
C17 CE	11,92974	13,00991	2,331435	19,00592	0,979798	Confirmed

MeanImp= media del valore di importanza; medianImp = mediana del valore di importanza; minImp = minimo del valore di importanza; maxImp = massimo del valore di importanza; decision = esito decisionale del test di Boruta.

L'unico parametro predittivo nei confronti dell'elevata concentrazione ematica dei NEFA (>0,5 mEq/L), selezionato attraverso il test di Boruta, è il C17 appartenente alla frazione lipidica dei esteri del colesterolo. L'acido grasso C17 CE è risultato avere valore predittivo nei confronti dello stato di iperchetonemia, ma non sussistono differenze significative tra il gruppo NEFA-0 e NEFA-1 quanto riguarda l'analisi della varianza. Questo effetto è legato all'uso del Boruta test che può generare questo tipo di distorsioni. Per questo motivo tutti i valori di questa statistica sono stati riverificati per attestare l'effettiva esistenza di una differenza significativa tra i gruppi presi in considerazione. In seguito è stata eseguita l'analisi della curva ROC sui parametri predittivi, al fine di stabilire un cut-off per gli acidi grassi selezionati mediante il Boruta test. Questo ci permette di determinare se l'animale è sano o ha una elevata concentrazione di corpi chetonici (BHB>1,0 mmol/L o NEFA>0,5 mEq/L).

Nella tabella 11 sono riportati gli acidi grassi e i parametri presenti nel latte con valore predittivo sul BHB, derivanti dall'analisi statistica del Boruta Test, con la successiva analisi della curva ROC.

Tabelle 11. Risultati relativi alla ROC dei parametri predittivi per lo sviluppo di iperchetonemia in bovine facenti parte del gruppo BHB-1.

<b>Parametro</b>	<b>Cut off</b>	<b>AUC</b>	<b>Se</b>	<b>95% CI for Se</b>	<b>Sp</b>	<b>95% CI for Sp</b>
<i>C22:5<math>\omega</math>3 CE</i>	≤0.03601	0,908	93,33	68.1 - 99.8	80,65	62.5 - 92.5
<i>C14 CE</i>	≤0.41860	0,811	53,33	26.6 - 78.7	96,77	83.3 - 99.9
<i>C20:3<math>\omega</math>6 CE</i>	≤0.02324	0,869	93,33	68.1 - 99.8	77,42	58.9 - 90.4
<i>C6 CE</i>	≤0.31086	0,877	100	78.2 - 100.0	74,19	55.4 - 88.1
<i>mgFA/dl CE</i>	≤24.13996	0,859	86,67	59.5 - 98.3	74,19	55.4 - 88.1
<i>C20 PL</i>	≤0.06530	0,680	62,5	35.4 - 84.8	96,87	83.8 - 99.9
<i>C22:1<math>\omega</math>9 FFA</i>	>0.00798	0,948	91,67	61.5 - 99.8	96,43	81.7 - 99.9
<i>C22 CE</i>	≤0	0,843	93,33	68.1 - 99.8	77,42	58.9 - 90.4
<i>C8 CE</i>	≤0.93685	0,873	93,33	68.1 - 99.8	74,19	55.4 - 88.1
<i>C22:1<math>\omega</math>9 CE</i>	≤0.04890	0,839	100	78.2 - 100.0	67,74	48.6 - 83.3
<i>C6 FFA</i>	>6.23332	0,943	75	42.8 - 94.5	100	87.7 - 100.0
<i>C20:3<math>\omega</math>3 TG</i>	>0.13505	0,752	64,71	38.3 - 85.8	86,21	68.3 - 96.1
<i>C24 CE</i>	≤0.07951	0,782	100	78.2 - 100.0	61,29	42.2 - 78.2
<i>C20:4<math>\omega</math>6 TG</i>	>1.74674	0,84	76,47	50.1 - 93.2	82,76	64.2 - 94.2
<i>C23 CE</i>	>0.11619	0,083	93,33	68.1 - 99.8	80,65	62.5 - 92.5

*AUC, Area Under the Curve/ area sotto la curva; Se, Epidemiologic Sensitivity/ sensibilità; Sp, Epidemiologic Specificity/ specificità*

Prendendo in considerazione solamente i parametri predittivi che presentano una AUC superiore al 70%, sono state selezionate 14 variabili con un potere predittivo da moderato a molto accurato. I parametri predittivi con una moderata accuratezza (0,7<AUC<0,9) sono 10. Per ognuno viene riportato un valore cut-off stabilito dall'analisi statistica, oltre che al valore relativo alla sensibilità e specificità del test diagnostico:



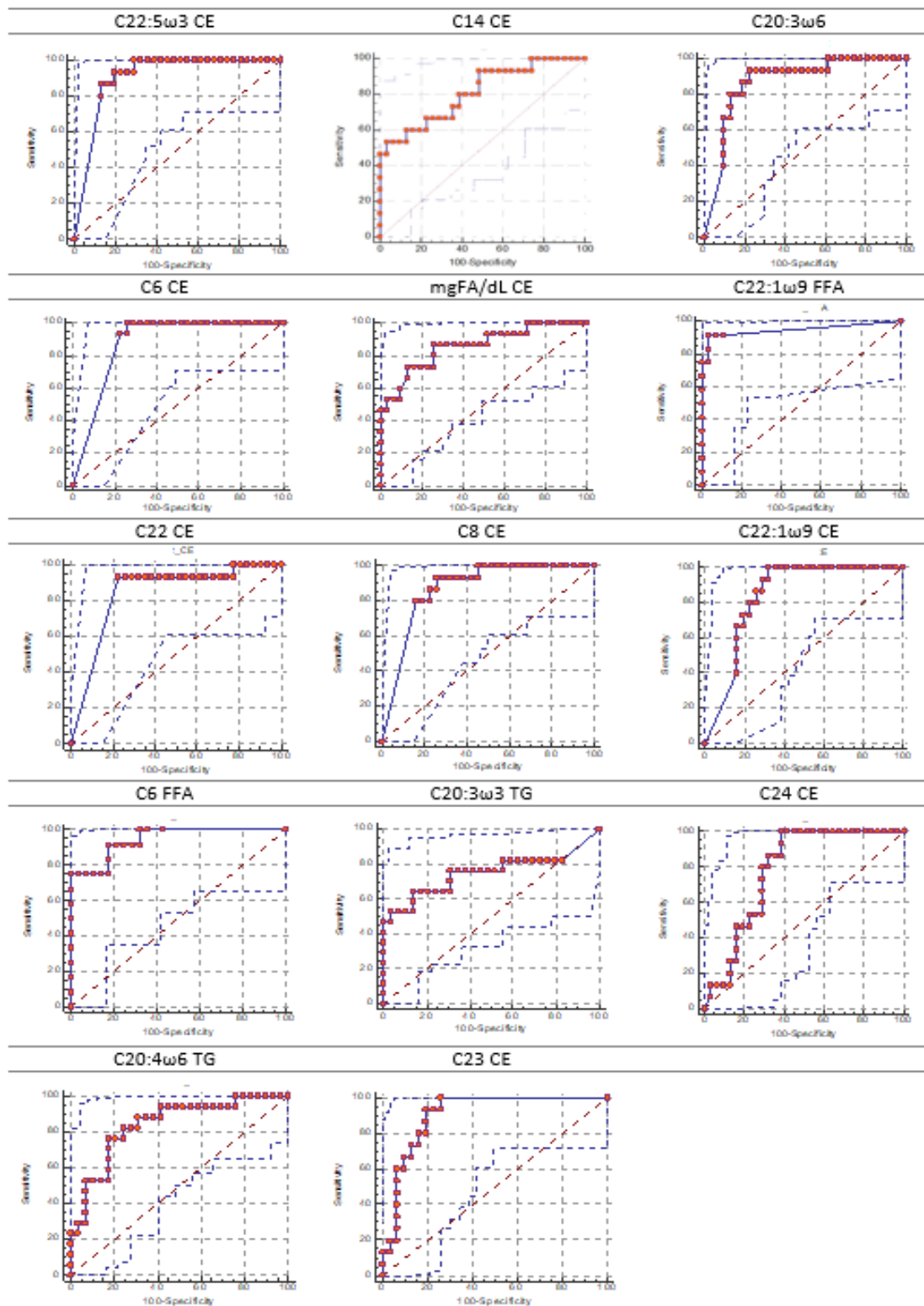
- C6 (cut-off $\leq$ 0.31086; Se 100%; Sp 74,19 %), C8 (cut-off $\leq$ 0.93685; Se 93,33%; Sp 74,19%), C14 (cut-off  $\leq$ 0.41860; Se 53,33%; Sp 96,77%), C20:3 $\omega$ 6 (cut-off  $\leq$ 0.02324; Se 93,33%; Sp 77,42%), C22 (cut-off  $\leq$ 0; Se 93,33%; Sp 77,42%), C22:1 $\omega$ 9 (cut-off  $\leq$ 0.04890; Se 100%; Sp 67,74%) C24 (cut-off  $\leq$ 0.07951; Se 100%; Sp 61,29%) e mgFA/dl (cut-off  $\leq$ 24.13996; Se 86,67%; Sp 74,19%) appartenenti alla frazione lipidica degli esteri del colesterolo.
- C20:3 $\omega$ 3 (cut-off $>$ 0.13505; Se 64,71%; Sp 86,21%) e C20:4 $\omega$ 6 (cut-off $>$ 1.74674; Se 76,47%; Sp 74,19%) appartenenti alla frazione lipidica dei trigliceridi.

I parametri predittivi con una elevata accuratezza (AUC $>$ 0,9) sono 4:

- C6 (cut-off $>$ 6.23332; Se 75%; Sp 100%) e C22:1 $\omega$ 9 (cut-off $>$ 0.00798; Se 91,67%; Sp 96,43%) appartenenti alla frazione lipidica degli acidi grassi liberi.
- C22:5 $\omega$ 3 (cut-off $\leq$ 0.03601; Se 93,33%; Sp 80,65%) e C23 (cut-off $>$ 0.11619; Se 100%; Sp 74,19%) appartenenti alla frazione lipidica degli esteri del colesterolo.

Nell'immagine 3 sono riportate le curve ROC dei parametri il cui valore di AUC è maggiore di 0,7 con un potere predittivo da moderatamente accurato a molto accurato.

Immagine 3. Curve ROC relative ai parametri con potere predittivo nei confronti dell'iperchetonemia, derivanti dal Boruta Test. L'immagine riporta solo i parametri con una AUC>0,70.



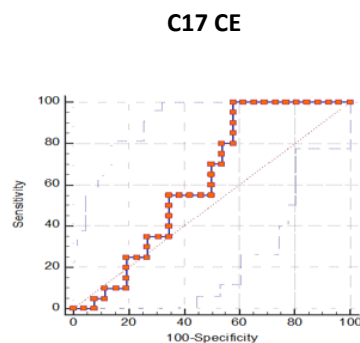
Nella tabella 10 viene riportato un solo parametro presente nel latte con valore predittivo sullo stato di iperchetonemia (NEFA>0,5mEq/L), derivante dall'analisi statistica del Boruta Test, con la successiva analisi della curva ROC. Nell'immagine 4 seguente è riportata la curva ROC del parametro C17 appartenente alla frazione lipidica degli esteri del colesterolo, il cui valore di AUC è inferiore di 0,7 con un potere predittivo poco accurato.

Tabella 10. Risultati relativi alla ROC dei parametri selezionati attraverso Boruta Test. Nella tabella è presente un unico parametro predittivo per lo sviluppo di patologie metaboliche in bovine facenti parte del gruppo NEFA-1.

<b>Parametro</b>	<b>Cut off</b>	<b>AUC</b>	<b>Se</b>	<b>95% CI for Se</b>	<b>Sp</b>	<b>95% CI for Sp</b>
<b>C17 CE</b>	>0.20952	0,621	100	83.2 - 100.0	42,31	23.4 - 63.1

*AUC, Area Under the Curve/ area sotto la curva; Se, Epidemiologic Sensitivity/ sensibilità; Sp, Epidemiologic Specificity/ specificità*

Immagine 3. Curva ROC relativa al parametro C17 CE con potere predittivo sulla concentrazione plasmatica dei NEFA, ottenuto dal Boruta Test. L'immagine riporta una AUC<0,70, classificando il parametro come poco accurato ai fini diagnostici.



L'analisi ROC del parametro C17 (Se 100%, Sp 42,31%) appartenente alla frazione lipidica degli esteri del colesterolo, presenta un'AUC inferiore a 70% e per le finalità di questa statistica rientra a far parte dei parametri con scarso potere predittivo nei confronti del valore dei NEFA.



## 7. DISCUSSIONE

Il progetto, presentato nelle pagine precedenti, si inserisce nel contesto di un ambito di ricerca che negli ultimi anni è stato decisamente produttivo: quello inerente allo studio del metabolismo lipidico della bovina da latte in relazioni a diversi fattori fisiologici, patologici, ambientali ed alimentari.

In particolare, per quanto riguarda il presente lavoro, abbiamo considerato come varia la composizione lipica del latte in relazione alla fase iniziale della lattazione, con tutte le conseguenze sul metabolismo che ne conseguono.

In letteratura scientifica, le concentrazioni plasmatiche di BHB e NEFA sono considerati essere degli importanti fattori rischio per lo sviluppo di patologie metaboliche e non solo (Ospina, 2010).

Per questo motivo abbiamo deciso di prendere in considerazione due parametri, quali il valore del BHB e dei NEFA a livello ematico, e di relazionarli alla variazione percentuali delle diverse classi lipidiche e dei singoli acidi grassi.

Il lavoro scientifico di Van der Drift (2012) dimostra come il valore ematico del BHB aumenti con il numero di lattazioni, così come è significativamente più elevato nell'intervallo che va da 5 a 30 DIM. Nella nostra popolazione di studio sono apparse differenze statisticamente significative tra il gruppo di animali sani e quelli iperchetonemici per quanto riguarda i DMI, con  $p < 0,001$  (30,16 vs 23,00), mentre non risulta esserci una differenza statisticamente significativa per quanto riguarda il numero di parti (2,31 vs 3,65). Inoltre abbiamo evidenziato che la produzione lattea del gruppo BHB-1 è significativamente più bassa rispetto al gruppo BHB-0, con valore  $p < 0,001$  (23,90 vs 30,53). Tuttavia, il calo della produzione lattea, nel gruppo di animali in iperchetonemia, è risultato essere in linea con quanto ci saremmo attesi (McArt et al., 2012).

Le bovine facenti parte del gruppo NEFA-1, presentavano differenze statisticamente significative ( $p < 0,001$ ) per le stesse variabili già messe in evidenza per il BHB. Infatti gli animali con un'elevata concentrazione ematica di NEFA presentavano un punteggio di BCS maggiore rispetto al gruppo di animali sani (2,89 vs 2,75), avevano trascorso un minor numero di DIM (25,76 vs 28,34) e una produzione lattea più elevata (30,71 vs 28,40). Queste evidenze erano per lo più attese dal momento che è noto che un animale con un'eccessivo stato di nutrizione tende ad avere un calo dell'ingestione volontaria più pronunciato durante il periodo di transizione e di conseguenza incorre in un periodo di NEB più severo e prolungato rispetto alle bovine con uno stato di nutrizione adeguato (Treacher et al., 1986). Per altro, il valore di NEFA raggiunge il picco solitamente tra la prima e la seconda settimana *post-partum*, motivo per cui era lecito attendersi che gli animali del gruppo NEFA-1

avessero trascorso un minor numero di DIM (McCarthy et al., 2015). La maggiore lipomobilitazione può associarsi ad un maggior output energetico determinato dalle elevate produzioni nel periodo immediatamente successivo al parto, non pienamente soddisfatto dalla quantità e qualità della razione (Constable et al., 2016). Questa evidenza ci porta a riflettere sul fatto che, nell'azienda in questione, non era somministrata una dieta specifica nel periodo di steaming up, per le bovine "fresche" e "freschissime".

Confrontando le singole classi lipidiche di appartenenza di ciascun acido grasso, possiamo notare delle tendenze generali che si verificano per molti degli acidi grassi appartenenti a quella specifica frazione lipidica del latte.

Nella classe lipidica dei CE si osserva una complessiva diminuzione dei vari acidi grassi nelle bovine con valore di BHB > 1,0 mmol/L, con differenze statisticamente significative per i parametri C6, C8, C14, C18, C18:1 $\omega$ 9, C18:2 $\omega$ 6, C18:3 $\omega$ 6, C20:2 $\omega$ 6, C20:3 $\omega$ 6, C20:5 $\omega$ 3, C22, C22:1 $\omega$ 9, C22:2 $\omega$ 6, C22:4 $\omega$ 6, C22:5 $\omega$ 3, C23 e C24. Inoltre, risulta essere significativo il valore totale della classe dei CE, considerata sia come quantità di molecole totali per unità di volume (Mg/dl di CE), sia come quantità di acidi grassi totali, legati alla molecola del colesterolo, per unità di volume (Mg FA/dl).

In questo caso tutti i parametri significativi presi in considerazione ad accezione del C23 risultano essere significativamente più bassi negli animali appartenenti al gruppo BHB-1.

La stessa tendenza generale non è altrettanto evidente se confrontiamo gli animali del gruppo NEFA-0 con quelli del gruppo NEFA-1; eccezion fatta per degli acidi grassi C10 e C20:5 $\omega$ 3 che sono significativamente meno presenti in quest'ultimo gruppo.

Queste osservazioni rispecchiano in parte le nostre previsioni, in quanto, come affermano Nakawaga e Katoh (1998) nella loro pubblicazione, bovine in chetosi hanno quantitativi ematici dell'enzima lecitina colesterolo acil-transferasi (LCAT) e di CE che decrescono in maggior misura rispetto ai quantitativi presenti in bovine sane (Nakawaga e Katoh, 1998). Per questo motivo il loro uptake da parte della ghiandola mammaria, già di per sé basso, potrebbe essere ancora meno pronunciato (Mansbridge e Blake 1997).

Possiamo osservare una diminuzione dei PL, presente nel latte delle bovine affette da iperchetonemia, pur non risultando significativa all'analisi della varianza. A questo proposito, Nakawaga e Katoh (1998) hanno evidenziato un minor quantitativo di fosfolipidi plasmatici in bovine affette da chetosi rispetto alle bovine presentanti buono stato di salute (Nakawaga e Katoh, 1998). In accordo con i già citati Mansbridge e Blake (1997), possiamo sostenere che i PL sono

particolarmente concentrati nella frazione delle HDL e LDL nel sangue, il cui uptake da parte della ghiandola mammaria non è molto elevato (Mansbridge e Blake 1997). Di conseguenza, sarebbe stato logico aspettarsi una significativa diminuzione di molti acidi grassi appartenenti a questa classe, nel latte delle bovine in iperchetonemia.

Per questo motivo, è degno di nota sottolineare che l'acido grasso C24 risulta essere significativamente più elevato nelle bovine affette da iperchetonemia.

Confrontando il gruppo di animali sani con il gruppo di animali con una elevata lipomobilizzazione si può notare un generale rialzo degli acidi grassi appartenenti alla frazione dei PL negli animali con elevate concentrazioni plasmatiche di NEFA; anche in questo caso la differenza tra i gruppi non è supportata dai dati statistici.

L'unico dato significativo è riferibile all'acido grasso C22:6 $\omega$ 3, che si trova in proporzioni minori nelle bovine con un elevato tasso di lipomobilizzazione (gruppo NEFA-1), in controtendenza rispetto agli altri valori.

Il lavoro di Sánchez-Juanes et al. (2008) testimonia che, nella frazione lipidica dei PL del latte, gli acidi grassi più rappresentativi siano soprattutto i LCFA e MCFA saturi come il C12, il C14, il C16 e il C18, oltre che alcuni altri insaturi tra cui soprattutto C18:1, C18:2.

Paragonando i nostri risultati inerenti alla classe lipidica dei PL, possiamo dire che i nostri risultati siano sostanzialmente sovrapponibili. Tuttavia, per quanto riguarda questi specifici acidi grassi, non esistono differenze sostanziali dal punto di vista statistico tra gli animali sani e quelli affetti da iperchetonemia, così come nessuna differenza significativa è stata rilevata tra gli animali sani e quelli con una concentrazione plasmatica di NEFA elevata.

I FFA solitamente sono presenti nel latte bovino in quantità ridotte, quantificabili in una quantità compresa tra gli 0,5 e i 1,2mmol/L su 100 gr (Hanus O. et al., 2008). Le nostre analisi svolte sul latte si rispecchiano su queste proporzioni. Attraverso l'analisi della varianza, abbiamo riscontrato differenze statisticamente significative per gli acidi grassi C6, C22:1 $\omega$ 9, C22:2 $\omega$ 6, C22:5 $\omega$ 3 e C22:6 $\omega$ 3 tra il gruppo di BHB-0 e BHB-1. Tutti questi parametri sono significativamente più alti nel gruppo di animali in iperchetonemia. Il fatto che sussista un'alta significatività da parte degli acidi grassi appartenenti alla famiglia dell'acido eicosatrienoico, con vari gradi di insaturazione, ci fa propendere per l'ipotesi che ci sia una elevata mobilizzazione di questo acido grasso all'interno della classe degli FFA, e che questo venga successivamente metabolizzato a livello mammario, attraverso reazioni di progressiva desaturazione della catena carboniosa.

Analizzando la frazione lipidica dei TG, possiamo osservare che la quasi totalità degli acidi grassi aumenta in maniera significativa sia nel gruppo degli animali affetti da iperchetonemia (C6, C8, C10, C12, C14, C14:1 $\omega$ 5, C16, C16:1 $\omega$ 7, C17, C18, C18:1 $\omega$ 9, C18:2 $\omega$ 6, C18:3 $\omega$ 6, C20, C20:3 $\omega$ 6, C20:4 $\omega$ 6, C20:3 $\omega$ 3, C22, C22:4 $\omega$ 6, C24, C24:1 $\omega$ 9, e il valore totale della classe dei TG), sia per quelli con un'elevata concentrazione plasmatica di NEFA (C14:1 $\omega$ 5, C16, C16:1 $\omega$ 7, C17, C18:1 $\omega$ 9, C18:3 $\omega$ 3, C20:1 $\omega$ 9 C22, C22:4 $\omega$ 6). In letteratura scientifica, viene riportato che il 96-98% della composizione lipidica del latte è costituita da trigliceridi (Strzałkowska et al., 2009). Quindi, da parte nostra, era ampiamente prevedibile che molte delle differenze statisticamente significative tra i vari acidi grassi avrebbero chiamato in causa questa classe lipidica.

Molti degli acidi grassi in questione, appartengono alla famiglia dei LCFA e dei VLCFA. Nella pubblicazione di Shingfield and Griinari (2007), viene spiegato che la quasi totalità degli acidi grassi aventi una catena carboniosa con più di 16 atomi di carbonio viene attinto dal circolo ematico. Alla luce di questa osservazione, possiamo sostenere l'ipotesi che ci sia una spiccata lipomobilizzazione di LCFA e VLFA per questa specifica classe.

Come affermano Gross et al. (2011), la presenza dei diversi acidi grassi può cambiare profondamente durante le prime settimane di lattazione. La mobilizzazione delle riserve lipidiche corporee precede lo sviluppo della chetosi, e l'incorporazione di taluni acidi grassi (C16, il C18 e C18:1 $\omega$ 9) all'interno delle varie frazioni lipidiche del latte, può essere utilizzato come marker per predire uno stato di iperchetonemia (Van Haelst et al., 2008).

Malgrado Van Haelst et al. (2008) dimostrino nella loro pubblicazione che l'acido grasso maggiormente significativo presente nel latte delle bovine in iperchetonemia sia il C18:1 $\omega$ 9, il suo ruolo di potenziale marker viene posto in discussione dagli stessi autori poiché essi stessi riscontrano che l'alimentazione può avere una sostanziale influenza sui risultati.

Nel nostro studio queste osservazioni sono state parzialmente attese, anche se, a differenza del lavoro precedentemente citato, la nostra analisi ha valutato la differenza tra i diversi acidi grassi distinti per classe lipidica di appartenenza. Nella tabella 5, relativa alla classe lipidica del latte dei CE, si può evidenziare una differenza statisticamente significativa tra il valore degli acidi grassi C18 e C18:1 $\omega$ 9 tra gli animali appartenenti al gruppo BHB-0 e quelli appartenenti al gruppo BHB-1. Considerando i dati relativi alla frazione lipidica del latte dei TG, presenti nella tabella 6, possiamo vedere che esistono differenze statisticamente significative tra il gruppo BHB-0 e BHB-1 nei valori di C16, il C18 e C18:1 $\omega$ 9. Tuttavia le altre classi lipidiche considerate non hanno rispettato queste



previsioni. Per giunta, nel proseguo del nostro studio, nessuno di questi acidi grassi si è dimostrato essere un parametro in grado di discriminare gli animali sani da quelli in iperchetonemia.

Nell'articolo di Mann et al. (2016), vengono proposti alcuni acidi grassi presenti nel latte con potere predittivo sullo stato di iperchetonemia (C6, C8, C10, C12, C14, C15 e C18:1 $\omega$ 9) e su una concentrazione plasmatica di NEFA elevata (C15, C16:1 $\omega$ 9 e C18:1 $\omega$ 9). Anche in questo caso, a differenza del nostra, lo studio non differenzia tra le diverse classi lipidiche di appartenenza di ogni singolo acido grasso messo in esame. Purtroppo i limiti tecnici, derivanti dalla tecnica gascromatografica da noi utilizzata, non ci hanno permesso di determinare l'effettiva proporzione dell'acido grasso C16:1 $\omega$ 9 nella frazione lipidica del latte e da questo punti di vista i nostri risultati non sono paragonabili. Inoltre, il C15 è stato aggiunto alle classi lipidiche dei CE, TG e PL come standard interno e per questo motivo è stato escluso dalle variabili considerate per queste classi.

Confrontando, invece, il gruppo BHB-0 con il gruppo BHB-1, sono emerse differenze statisticamente significative per il valore degli acidi grassi C6, C8, C14 e C18:1 $\omega$ 9 appartenenti alla classe lipidica dei CE; per il valore dell'acido grasso C6 appartenente alla calsse lipidica dei FFA; per il valore di C6, C8, C10, C12, C14 e C18:1 $\omega$ 9 appartenenti alla classe lipidica dei TG.

Infine, non sono emerse differenze statisticamente significative per il valore di C18:1 $\omega$ 9 tra il gruppo NEFA-0 e il gruppo NEFA-1 per nessuna delle classi lipidiche da noi considerate.

Le differenze riscontrate con le previsioni di Mann et al., probabilmente sono imputabili al fatto che le bovine, dello studio precedentemente menzionato, sono state campionate nel periodo che va dal terzo al quattordicesimo giorno di lattazione. Nel nostro caso invece, alcune bovine si trovavano nella quarta o quinta settimana di lattazione, con una media di 27,32 DIM.

Mediante il test di Boruta (figura 1 e 2) è stato possibile individuare quali fossero gli acidi grassi in grado di fungere da parametro con maggiore potere predittivo su 131 catene carboniose analizzate, nei confronti dello stato di iperchetonemia (BHB-1), o con una elevata concentraziobe di NEFA a livello ematico (NEFA-1).

Il fatto di aver individuato un unico parametro predittivo nei confronti dei NEFA, abbiamo ipotizzato potesse essere imputabile al fatto che queste molecole presenti nel circolo ematico in soluzione oppure legate alle albumine, subiscano una precedente metabolizzazione a livello epatico prima di essere captati dal tessuto mammario.

I parametri predittivi per lo stato di iperchetonemia (BHB>1,0 mmol/L), selezionati mediante il Boruta Test sono stati:

- C6, C8, C14, C20:5 $\omega$ 3, C20:3 $\omega$ 6, C22, C22:1 $\omega$ 9, C22:5 $\omega$ 3, C23, C24 e mgFA/dl per la classe dei CE;
- C20 per la classe dei PL;
- C6 e C22:1 $\omega$ 9 per la classe degli FFA;
- C20:3 $\omega$ 3 e C20:4 $\omega$ 6 per la classe dei TG;

Ad una prima osservazione si può constatare che molti dei parametri risultati essere significativi sono LCFA e questo risulta essere in linea con le osservazioni di Van Haelst (2008). Tuttavia sappiamo che il contenuto di LCFA del latte può essere ampiamente influenzato dall'alimentazione. La pubblicazione di Rutkowska et al. (2015) dimostra che i semi di soia aumentano il contenuto in acidi grassi polinsaturi  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6. I semi di colza invece, determinano un aumento della proporzione del RA e C18:1 $\omega$ 9, ed una concomitante diminuzione del C14:0 e C16:0 (Rutkowska et al., 2015). Come possiamo osservare, anche molti dei nostri parametri significativi sono acidi grassi polinsaturi  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6, perciò la differenza tra i due gruppi di animali potrebbe essere imputabile ad una maggiore mobilizzazione lipidica in concomitanza con una dieta ricca di semi oleinosi.

Il maggior numero di parametri con potere predittivo riportati nei nostri risultati appartiene alla classe lipidica dei CE. In questo caso abbiamo riscontrato differenze significative per molti acidi grassi (ben 11) tra il gruppo di animali sani e quello degli animali iperchetonemici. Questo è coerente con le nostre aspettative dal momento che avevamo rilevato un gran numero di differenze statisticamente significative, attraverso l'analisi della varianza, per numerosi acidi grassi appartenenti alla classe dei CE.

Il nostro unico parametro predittivo nei confronti dello stato di iperchetonemia, appartenente ai PL, è il C:20, il quale risulta essere inferiore nel gruppo delle bovine con una concentrazione ematica di BHB>1,0mmol/L.

Per quanto riguarda la classe lipidica degli FFA, possiamo notare la presenza di due parametri con potere predittivo. Il C6 risulta essere significativamente più elevato in questa classe lipidica per gli animali in iperchetonemia e questa osservazione è in linea con quanto affermato da Mann et al. (2016). Questo parametro, per altro, risulta essere una variabile significativa per diverse classi lipidiche considerate, anche se il Boruta test non ha confermato il suo potere predittivo per tutte le classi in questione. L'altro parametro con potere predittivo è il C22:1 $\omega$ 9 che nei nostri risultati risulta essere significativamente più basso nel gruppo BHB-1 (tabella 7). Questa osservazione si discosta rispetto ai risultati ottenuti da Vranković et al. (2017), che al contrario affermano che la

concentrazione di MUFA e PUFA nel latte sia più bassa nelle bovine affette da un NEB più intenso, pur non distinguendo per singole classi lipidiche come nel nostro caso.

La presenza di solamente 2 parametri significativi appartenenti ai TG da un lato disattende le nostre aspettative, poichè avevamo notato che effettivamente ci fosse una differenza statisticamente significativa, per molti acidi grassi della frazione dei TG e sulla quantità totale TG, tra il gruppo di bovine sane e quelle affette da iperchetonemia, con una proporzione superiore a favore di queste ultime.

L'unico parametro con potere predittivo nei confronti dell'elevata concentrazione plasmatica dei NEFA è stato riscontrato essere l'acido grasso C17 appartenente alla classe lipidica degli esteri del colesterolo. A differenza di quanto affermato nella pubblicazione di Jorjong et al. (2014), non abbiamo riscontrato un potere predittivo accettabile da parte dell'acido grasso C18:1 $\omega$ 9 nei confronti di una concentrazione plasmatica dei NEFA elevata. Nonostante quanto affermato in precedenza, sussistono differenze significative per quanto riguarda l'analisi della varianza tra il gruppo NEFA-0 e NEFA-1 per questo il parametro C17 appartenente ai CE. Questo aspetto contraddittorio delle nostre statistiche è dovuto all'utilizzo del test di Boruta. L'algoritmo del test crea degli attributi ombra, che vengono progressivamente confrontati con quelli resi disponibili al test. Gli attributi che hanno un'importanza peggiore di quelli ombra, vengono progressivamente scartati. D'altra parte, gli attributi che sono significativamente migliori di quelli ombra sono ammessi per essere confermati. Gli attributi ombra vengono ricreati in ogni interazione e l'algoritmo si interrompe quando rimangono solo gli attributi confermati. L'algoritmo può continuare a lavorare fino a quando raggiunge il numero massimo di operazioni ottenute dalle interazioni risultanti dal test. Questo può portare a delle distorsioni come quella appena evidenziata e ha richiesto, da parte nostra, un attento lavoro di confronto fra le statistiche ottenute.

Infine, mediante l'analisi delle curve ROC siamo stati in grado di stabilire un valore cut-off per ciascun parametro dotato di potere predittivo nei confronti dello stato di iperchetonemia (BHB-1) o di una elevata concentrazione plasmatica di NEFA (NEFA-1). Per ogni parametro è stata, inoltre, stabilita l'accuratezza statistica di un eventuale test basato su quel tipo di variabile (Se, Sp). Tra tutti i parametri selezionati attraverso il Boruta Test abbiamo considerato solamente quelli con una  $AUC > 0,7$  che si traduce con una moderata accuratezza da parte dell'ipotetico test. I risultati sono stati molto soddisfacenti, soprattutto per quanto riguarda la capacità predittiva di questi parametri nei confronti dello stato di iperchetonemia.

I parametri predittivi con una moderata accuratezza ( $0,7 < AUC < 0,9$ ) sono 11:

- C6 (cut-off  $\leq 0.31086$ ; Se 100%; Sp 74,19 %), C8 (cut-off  $\leq 0.93685$ ; Se 93,33%; Sp 74,19%), C14 (cut-off  $\leq 0.41860$ ; Se 53,33%; Sp 96,77%), C20:3 $\omega$ 6 (cut-off  $\leq 0.02324$ ; Se 93,33%; Sp 77,42%), C22 (cut-off  $\leq 0$ ; Se 93,33%; Sp 77,42%), C22:1 $\omega$ 9 (cut-off  $\leq 0.04890$ ; Se 100%; Sp 67,74%) C24 (cut-off  $\leq 0.07951$ ; Se 100%; Sp 61,29%) e mgFA/dl (cut-off  $\leq 24.13996$ ; Se 86,67%; Sp 74,19%) appartenenti alla frazione lipidica degli esteri del colesterolo;
- C20:3 $\omega$ 3 (cut-off  $> 0.13505$ ; Se 64,71%; Sp 86,21%) e C20:4 $\omega$ 6 (cut-off  $> 1.74674$ ; Se 76,47%; Sp 74,19%) appartenenti alla frazione lipidica dei trigliceridi.

Invece, quelli maggiormente accurati erano 4 parametri ( $AUC > 0,9$ ):

- C22:5 $\omega$ 3 (cut-off  $\leq 0.03601$ ; Se 93,33%; Sp 80,65%) e C23 (cut-off  $> 0.11619$ ; Se 100%; Sp 74,19%) appartenenti alla frazione lipidica degli esteri del colesterolo.
- C6 (cut-off  $> 6.23332$ ; Se 75%; Sp 100%) e C22:1 $\omega$ 9 (cut-off  $> 0.00798$ ; Se 91,67%; Sp 96,43%) appartenenti alla frazione lipidica degli acidi grassi liberi.

L'unico parametro selezionato, dotato di potere predittivo nei confronti di una elevata concentrazione ematica di NEFA (C17 della frazione lipidica dei CE), si è dimostrato avere una accuratezza bassa in seguito all'esame della curva ROC ( $AUC < 0,7$ ). Questo parametro era già stato discusso in precedenza, in merito al test di Boruta, che ci aveva restituito dei risultati contraddittori rispetto all'analisi della varianza. In questo caso, l'analisi della curva ROC attribuisce all'acido grasso C17 della frazione lipidica dei CE una capacità predittiva al di sopra del valore cut-off di 0.20952 mg/dL nel latte (Se 100%; Sp 42,31%). Dal momento che la potenziale accuratezza del test, nell'individuare uno stato di eccessiva mobilizzazione lipidica, risulta essere bassa, non riteniamo che questo acido grasso possa discriminare in maniera soddisfacente gli animali positivi dai sani.

Nel corso di questo lavoro abbiamo riscontrato delle difficoltà oggettive nel doverci confrontare con gli altri lavori scientifici che trattavano di questo specifico argomento. In molte delle pubblicazioni esistenti, a differenza di quanto fatto da noi, venivano presi in considerazione un numero decisamente più limitato di acidi grassi. Inoltre, molti di questi lavori non distinguevano la diversa classe lipidica di appartenenza di ciascun acido grasso, rendendo i risultati ottenuti difficilmente

paragonabili ai nostri. Per questi motivi, spesso ci siamo trovati a raffrontarci con percentuali relative ad acidi grassi completamente diverse rispetto a quelle a nostra disposizione.

Un'altra evidenza che emerge dalla letteratura scientifica è rappresentata dall'influenza che può la tipologia dell'allevamento, la componente genetica e soprattutto l'alimentazione sui parametri da noi presi in considerazione (Hanuš et al., 2018). Questi aspetti da un lato rappresentano dei limiti relativi ai risultati ottenuti, ma d'altro canto ci permettono di applicarli in ambito clinico.

La supplementazione con taluni alimenti, in grado di influenzare il contenuto nel latte di specifici acidi grassi, potrebbe rappresentare una prospettiva terapeutica interessante nei confronti di bovine affette da problematiche metaboliche inerenti al bilancio energetico. Questo tipo di alimenti aggiunti alla normale razione potrebbero agire in prevenzione di queste aberrazioni del metabolismo lipidico della bovina durante il periodo di transizione.

Ad esempio, nel nostro lavoro, abbiamo riscontrato una significativa diminuzione di LCFA polinsaturi comune a molte classi lipidiche analizzate. Queste carenze potrebbero essere compensate con l'impiego di semi oleaginosi, particolarmente ricchi in PUFA, con scheletro carbonioso costituito a 18 atomi di carbonio (Hanuš et al., 2018). Inoltre è noto che l'acido eicosapentaenoico è molto concentrato nell'olio di pesce e questo potrebbe compensare la carenza specifica riscontrata nelle bovine in iperchetonemia per molte delle classi lipidiche considerate (Wall et al., 2010).

In ambito farmacologico è noto che la vitamina B (PP), o niacina, presenta attività inibente la lipolisi. Per questo motivo viene utilizzata al fine di diminuire i livelli ematici di NEFA e di corpi chetonici, attraverso l'aumento della biodisponibilità del glucosio a livello ematico (Dufva et al, 1983).

La pubblicazione di Weiss e Gonzalo (2006) suggerisce che, a causa del progresso genetico avvenuto negli ultimi anni e del miglioramento delle potenzialità produttive delle bovine, i relativi fabbisogni di niacina e di altre vitamine del gruppo B superino la capacità dei microrganismi ruminali di soddisfare a pieno la domanda dell'organismo (Weiss e Gonzalo, 2006).

In merito a questo, sarebbe opportuno considerare, in futuri lavori, come varia il profilo lipidico del latte in diete arricchite con niacina in merito ai parametri significativi individuati in questo studio.

Questo progetto amplia le conoscenze disponibili sul metabolismo lipidico durante il periodo di transizione e getta le basi per l'utilizzo di taluni parametri per indagare lo stato di salute dell'animale partendo da una matrice facilmente campionabile come il latte.



## 8. CONCLUSIONI

Il lavoro di ricerca ha permesso di individuare i principali acidi grassi presenti nel latte, con funzione predittiva per lo sviluppo di iperchetonemia e con una elevata concentrazione plasmatica di NEFA. I dati raccolti ci hanno permesso di valutare il trend degli acidi grassi, secreti nella frazione lipidica del latte, in bovine con differente valore ematico di BHB e NEFA.

La suddivisione dei singoli acidi grassi, nelle varie classi lipidiche di appartenenza, ha messo in evidenza differenze significative tra i gruppi di animali sani (BHB-0 e NEFA-0) e i gruppi di animali iperchetonemici (BHB-1) o con un'elevata concentrazione di NEFA a livello ematico per molti dei parametri da noi considerati.

I risultati, da noi ottenuti, dimostrano che il profilo lipidico del latte risulta essere profondamente influenzato dalla concentrazione ematica del BHB permettendoci di individuare un numero cospicuo di parametri predittivi sullo stato metabolico della bovina nella prima fase della lattazione. L'influenza della concentrazione plasmatica dei NEFA sembra essere meno determinante sul profilo lipidico del latte, probabilmente proprio perché i NEFA mobilizzati dalle riserve corporee subiscono una precedente metabolizzazione, a livello epatico, prima di raggiungere il tessuto mammario.

Queste evidenze ci suggeriscono che la gascromatografia può trovare un fruttuoso impiego come metodo per predire l'insorgenza di iperchetonemia.

Inoltre, l'aumento o la diminuzione selettiva di talune famiglie di acidi grassi appartenenti a specifiche classi lipidiche, può aprire prospettive interessanti nella comprensione del metabolismo parafisiologico della bovina affetta da iperchetonemia, durante le prime fasi di lattazione.

I margini della ricerca in ambito del profilo lipidico del latte nel periodo di transizione di bovine sono ancora ampi. La stessa tipologia di studio potrebbe essere applicata su di un numero superiore di animali per confermare le evidenze da noi riscontrate. Un altro aspetto che andrebbe implementato è lo studio della correlazione dei parametri predittivi individuati con l'alimentazione dell'animale; proprio per le influenze che è nota avere sul profilo lipidico del latte.

In ambito clinico e terapeutico, l'analisi dei differenti acidi grassi predittivi potrebbe essere eseguita mediante la somministrazione di diete arricchite in oli vegetali od integratori vitaminico-minerali o principi attivi farmacologici di integrazione, al fine di valutarne l'effetto sul profilo lipidico del latte, sulla salute e la produttività delle bovine affette da iperchetonemia nelle fasi iniziali della lattazione.





## BIBLIOGRAFIA

- Adewuyi A. A., Gruysi E., Van Eerdenburg F. J.C.M., 2005. Non Esterified Fatty Acids (NEFA) in Dairy Cattle. A Review. *Veterinary Quarterly* 27(3): 117–26.
- Agostoni C., Bruzzese M.G., 1992. Fatty acids: their biochemical and functional classification. *Medical and Surgical Pediatrics*, 14(5):473-479.
- Allen M. E., Young S.P., Michell R. H., Bacon P.A., 1995. Altered T lymphocyte signaling in rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*, 25:1547–1554.
- Allison R.D., Laven R.A., 2000. Effect of vitamin E supplementation on the health and fertility of dairy cows: a review. *Veterinary Record*, 147:703–708.
- Bauman D.E., Mather I.H., Wall R.J., Lock A.L., 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of Dairy Science*, 89:1235–1243.
- Bell A.W., 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*, 73: 2804-2819.
- Bernabucci U., Ronchi B., Lacetera N., Nardone A., 2005. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88:2017–2026.
- Bernard L., Bonnet M., Delavaud C., Delosiere M., Ferlay A., Fougere H., Graulet B., 2018. Milk fat globule in ruminant: Major and minor compounds, nutritional regulation and differences among species. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120:1700039.
- Bertics S.J., Grummer R.R., Cadorniga-Valino C., LaCount D.W., Stoddard E.E., 1992. Effect of prepartum dry matter intake and liver triglyceride concentration and early postpartum lactation. *Journal of Dairy Science*, 75:1914–1922.

- Behluli B., Musliu A., Sherifi K., Youngs C.R., 2017. Risk factors for occurrence of displaced abomasum and their relation to nutritional management of Holstein dairy cattle. *Veterinarski Arhiv*, 87(4):419-430.
- Block S.S., Butler W.R., Ehrhardt R.A., Bell A.W., Van Amburgh M.E., Boisclair Y.R., 2001. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy is by negative energy balance. *Journal of Endocrinology*, 171:339-348
- Bobe G., Young J.W., Beitz D.C., 2004. Invited Review: Pathology, Etiology, Prevention, and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 87:3105-3124.
- Bremmer D.R., Christiansen J.O., Grummer R.R., Rasmussen F.E., Wiltbank M.C., 1999. Effects of induced parturition and estradiol on feed intake, liver triglyceride concentration, and plasmametabolites in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82:1440–1448.
- Brzozowska A.M., Oprządek J., 2016. Metabolism of fatty acids in tissues and organs of the ruminants - a review. *Animal Science Papers and Reports*, vol. 34 n.3: 211-220.
- Butler S.T., Marr A.L., Pelton S.H., Radcliff R.P., Lucy M.C., Butler W.R., 2003. Insulin restores GH responsiveness during lactation induced NEBAL in dairy cattle: Effects on expression of IGF-1 and GH receptor-1a. *Journal of Endocrinology*, 176: 205-217.
- Burton A.J., Nydam D.V., Ollivett T.L., Divers T.J., 2009. Prognostic indicators for nonambulatory cattle treated by use of a flotation tank system in a referral hospital: 51 cases (1997-2008). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 234:1177-1182.
- Carlson D.B., Woodworth J.C., Drackley J.K., 2007. Effect of L-carnitine infusion and feed restriction on carnitine status in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 90(5):2367–2376.
- Carruthers D.M., Naylor W.G., Allen M.E., Kitas G.D., Bacon P.A., Young S.P., 1996. Characterization of altered calcium signalling in T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clinical and Experimental Immunology*, 105:291–296.

- Carruthers D.M., Arrol H.P., Bacon P.A., Young S.P., 2000. Dysregulated intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and Ca<sup>2+</sup> signaling in synovial fluid T lymphocytes from patients with chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheumatology*, 43:1257–1265.
- Castillo, C., Hernandez, J., Bravo, A., Lopez-Alonso, M., Pereira, V., Benedito, J.L., 2005. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Veterinary Journal*, 169:286–292
- Chagas L.M., Bass J.J., Blache D., Burke C.R., Kay J.K., Lindsay D.R., Lucy M.C., Martin GB., Meier S., Rhodes F.M., Roche J.R., Thatcher W.W., Webb R. 2007. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90:4022-4032.
- Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R.M., Doreau M., 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de Zootechnie*, 49:181-205.
- Chung I.M., Kim J.K., Lee K.J., Son N.Y., An M.J., Lee J.H., An Y.J., Kim S.H., 2018. Discrimination of organic milk by stable isotope ratio, vitamin E, and fatty acid profiling combined with multivariate analysis: A case study of monthly and seasonal variation in Korea for 2016–2017. *Food Chemical*. 261:112–123.
- Contreras G.A., O'Boyle N.J., Herdt T.H., Sordillo L.M., 2010. Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 93(6):2508-2516.
- Constable P.D., Miller G.Y., Hoffsis G.F., Hull B.L., Rings D.M., 1992. Risk factors for abomasal volvulus and left abomasal displacement in cattle, *American Journal Veterinary Research*. 53:1184-1192.
- Constable P.D., Hinchcliff K.P., Done S.H., Grünberg W., 2016. *Veterinary Medicine, a Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*, 11(2):1662-1757

- Constable P.D., 2014. Proceedings of XXVII World Buiatric Congress. Cairns, 59-63.
- Crouch S.P., Crocker I.P., Fletcher J., 1995. The effect of pregnancy on polymorphonuclear leukocyte function. *The Journal of Immunology*, 155: 5436-5443.
- DeGaris P.J., Lean I.J., 2009. Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. *Veterinary Journal*, 176:58-59.
- De Menezes A.B., Lewis E., O'Donovan M., O'Neill B.F., Clipson N., Doyle E.M., 2011. Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiology Ecology*, 78:256–265.
- Dirksen G., 1962. *Vorbetrachtungen zur Topographie, Die Erweiterung, Verlagerung und Drehung des Lebmages beim Rind*, Verlag Paul Parey, Berlin and Hamburg.
- Dohmen M.J., 2005. Effect of retained placenta on postpartum reproduction performance of Frisian cows. *Egyptian Journal of Animal Production*, 40:111-121.
- Drackley J.K., 1999. ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *Journal of Dairy Science*, 82:2259–2273.
- Duffield T., Blanc S.L.E., Leslie K., 2005. Impact of subclinical metabolic disease on risk of early lactation culling. *Journal of Dairy Science*, 88(1):199–200.
- Duffield T. F., Lissemore K. D., McBride B. W., Leslie K. E., 2009. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science*, 92(2):571–580.
- Dufva G.S., Bartley E.E., Dayton A.D., Riddell D.O., 1983. Effect of niacin supplementation on milk production and ketosis of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 66(11):2329-2336.

- Edmondson A.J., Lean D., Weaver I.D., Farver T., Webster G., 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 72: 68-78.
- Emery R.S., Liesman J.S., Herdt T.H., 1992. Metabolism of Long Chain Fatty Acids by Ruminant Liver. *Journal of Nutrition*, 122:832-837.
- Esposito G., Irons P.C., Webb E.C., Chapwanya A., 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 144:60-71.
- Forbes, J. M., 1977. Models of the control of food intake and energy balance in ruminants. In *Hunger Models: Quantitative Theory of Feeding Control* (Ed. Booth D.A.), Academic Press, London.
- Frelich J., Šlatctá M., Hanuš O., Špička J., Samková E., Węglarz A., Zapletal P., 2012. Seasonal variation in fatty acid composition of cow milk in relation to the feeding system. *Animal Science Papers and Reports*, 30:219-229.
- Fukao T., Mitchell G., Sass J.O., Hori T., Orii K., Aoyama Y., 2014. Ketone body metabolism and its defects. *Journal of Inheret Metabolism Disorder*. 37(4):541–551.
- Geishauser T., Leslie K., Duffield T., 2000. Metabolic Aspects in the Etiology of Displaced Abomasum. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 16(2): 255–265.
- Gerloof B.J., 2000 - Dry Cow Management for the Prevention of Ketosis and Fatty Liver in Dairy Cows. *Veterinary clinics of north America : Food and Practise*. 16(2):283–292.
- Goff J. P. and Horst R.L., 1997. Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to prepartum rations on milk fever in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 80:176.
- Goff J.P. and Kimura K., 2002. Effect of mastectomy on milk fever, energy, and vitamins A, E, and beta-carotene status at parturition. *Journal of Dairy Science*, 85(6):1427-36.

- Goff J.P., 2006. Major Advances in Our Understanding of Nutritional Influences on Bovine Health. *Journal of Dairy Science* 89(4): 1292–1301.
- Goff J.P., 2008. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176:50-57.
- Goff J.P., 2014. Calcium and Magnesium Disorders. *Veterinary Clinician of North America: Food Animal Practice*, 30(2):359-81.
- Grohn Y.T., Rajala-Schultz P.J., 2000. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 60-61:605-614.
- Gross J., van Dorland H.A., Bruckmaier R.M., Schwarz F.J., 2011. Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 78:479–488.
- Grum D.E., Drackley J.K., Younker R.S., La Count D.W., Veenhuizen J.J., 1996. Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 79:1850.
- Grummer R.R., Bertics S.J., LaCount D.W., Snow J.A., Dentine M.R., Stauffacher R.H., 1990. Estrogen induction of fatty liver in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 73:1537–4
- Grummer R.R., 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*. 73:2820-2833
- Grummer R.R., Mashek D.G., 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. Managing the transition cow to optimize health and productivity. *Veterinary Clinics North America* Cook N.B. & Nordlund K.V., Eds. W.B. Saunders Co, 6: 447-470.
- Gunter S.A., Judkins M.B., Krysl L.J., Broesder J.T., Barton R.K., Rueda B.R., Hallford D.M., Holcombe D.W., 1990. Digesta kinetics, ruminal fermentation characteristics and serum metabolites of pregnant and lactating ewes fed chopped alfalfa hay. *Journal of Animal Science*, 68:3821–31.

- Gunstone F., Harwood J., Dijkstra A., Murphy D., Quinn P., Erhan S., Scrimgeour C., Segers J., Huyghebaert A., Jie M., Foubert I., Christie W., Dewettinck K., McKeon T., Van de Walle D., Knothe G., Kenar J., Alander J., Koebnitz W., Evans M., Ramji D., 2007. *The Lipid Handbook with CD-ROM*. Boca Raton: CRC Press.
- Guyot H., Detilleux J., Lebreton P., Garnier C., Bonvoisin M., Rollin F., Sandersen C., 2017. Comparison of Various Indices of Energy Metabolism in Recumbent and Healthy Dairy Cows. *PloS one*, 12(1), e0169716.
- Hammon D.S., Evjen I.M., Dhiman T.R., Goff J.P., Walters J.L., 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(1–2):21–29.
- Hanuš O., Vegricht J., Frelich J., Macek A., Bjelka M., Louda F., Janů L. (2008): Analysis of raw cow milk quality according to free fatty acid contents in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*, 53:17–30.
- Hanuš O., Samková E., Křížtovà L., Hasonová L. And Kala R., 2018. Role of fatty acid in milk and the influence of seleted factors on variability. A review. *Molecules* 2018, 23(7):1636.
- Harris D.J., 1981. Factors predisposing to parturient paresis. *Australian Veterinary Journal.*, 57:357–361.
- Heuer C., Schukken Y.H., Dobbelaar P., 1999. Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 82:295–304
- Herdt T.H., 2000. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Veterinary Clinic of North American: Food Animal Practice*, 16(2):215–230.

- Herdt T.H., Stevens J.B., Olson W.G., Larson V., 1981. Blood concentrations of beta hydroxybutyrate in clinically normal Holstein-Friesian herds and in those with a high prevalence of clinical ketosis. *American Journal Veterinary Research*, 42(3):503–506.
- Holtenius P., and Traven M., 1990. Impaired glucose tolerance and heterogeneity of insulin responses in cows with abomasal displacement. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe A*, 37:445-451.
- Holtenius P., Holtenius K., 1996. New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: a review. *Zentralbl Veterinarmed A*, 43(10):579–587.
- Hoquette J.F., Bauchart D., 1999 – Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. *Reproduction Nutrition Development*, 39:27-48.
- Horst R.L., Goff J.P., Rainhardt T.A., 2005. Adapting to the transition between rat, human and dairy cow. *Journal of Mammary Gland biology and Neoplasia*, 10:141-156.
- Ingvartsen K.L. and Andersen J.B., 2000. Integration of Metabolism and Intake Regulation: A Review Focusing on Periparturient Animals. *Journal of Dairy Science*, 83:1573-1597.
- Jóźwik A., Strzałkowska N., Bagnicka E., Łagodziński Z., Pyzel B., Chyliński W., Czajkowska A., Grzybek W., Słoniewska D., Krzyżewski J., Horbańczuk J.O., 2010. The effect of feeding linseed cake on milk yield and milk fatty acid profile in goats. *Animal Science Papers and Reports*, 28(3):245-251.
- Jorgesen A., Picel K.C., Staumudis V.C., 1990. Prediction of Gas Chromatography Flame Ionization Detector Response Factors from Molecular Structures. *Analytical Chemistry*, 62(7):683-689.



- Jorjong S., Van Knegsel A.T.M., Verwaeren J., Lahoz M.V., Bruckmaier R.M., De Baets B., Kemp B. Fievez V., 2014. Milk fatty acids as possible biomarkers to early diagnose elevated concentrations of blood plasma nonesterified fatty acids in dairy cows. *Journal of dairy science*, 97(11):7054-7064.
- Jorritsma R., César M.L., Hermans J.T., Kruitwagen C.L.J.J., Vos P.L.A.M., Kruip T.A.M., 2004. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro. *Animal Reproduction Science*, 81: 225-235.
- Joosten I., Sanders M.F., Hensen E.J., 1991. Involvement of major histocompatibility complex class I compatibility between dam and calf in the aetiology of bovine retained placenta. *Animal Genetics* 22(6):455-463.
- Jubb T.F., Malmo J., Davis G.M., Vawser A.S., 1991. Left-side displacement of the abo-masum in dairy cows at pasture. *Australian Veterinary Journal*, 68:140-142.
- Kalač P. and Samková E., 2010. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 55(12): 521–537.
- Katoh, N. 2002. Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64:293-307.
- Kerestes M., Faigl V., Kulcsar M., Balogh O., Foldi J., Febel H., Chilliard Y., Huszenicza G., 2009. Periparturient insulin secretion and whole-body insulin responsiveness in dairy cows showing various forms of ketone pattern with or without puerperal metritis. *Domestic Animal Endocrinology*, 37:250-261.
- Kęsek M., Szulc T., Zielak-Steciwo A., 2014. Genetic, physiological and nutritive factors affecting the fatty acid profile in cows' milk - a review. *Animal Science Papers and Reports* 32:95-106.
- Ken'ichi Ichihara, Yumeto Fukubayashi, (2010) Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *The Journal of Lipid Research*, 51(3): 635–640.

- Kimura, K., Reinhardt, T.A., Goff, J.P., 2006. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 89, 2588–2595.
- Kvidera S.K., Horst E.A., Abuajamieh M., Mayorga E.J., Fernandez M.V., Baumgard L.H., 2017. Glucose requirements of an activated immune system in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 100:2360-2374.
- Laven R.A. and Peters A.R., 1996. Bovine retained placenta: aetiology, pathogenesis and economic loss. *Veterinary Record*, 139:465-471.
- LeBlanc S. J., Leslie K. E., Duffield T. F., 2005. Metabolic Predictors of Displaced Abomasum in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 88(1):159–170.
- Lee J. Y., Sohn K. H., Rhee S. H., Hwang D., 2001. Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4. *Journal of Biological Chemistry* 276(20): 16683–89.
- Leroy, J. L. M. R., Vanholder T., Mateusen B., Christophe A., Opsomer G., de Kruif A., Genicot G., and Van Soom A, 2005. Nonesterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 130:485–495.
- Li P., Li X.B., Fu S.X., Wu C.C., Wang X.X., Yu G.J., Long M., Wang Z., Liu G.W., 2012. Alterations of fatty acid b-oxidation capability in the liver of ketotic cows. *Journal of Dairy Science*. 95(4):1759–1766.
- Lunn J., Theobald H. E., 2006. The Health Effects of Dietary Unsaturated Fatty Acids. *Nutrition Bulletin* 31(3): 178–224.
- Mann S., Nydam D. V., Lock A. L., Overton T. R., McArt J. A. A. (2016). Association of milk fatty acids with early lactation hyperketonemia and elevated concentration of nonesterified fatty acids. *Journal of dairy science*, 99(7), 5851-5857.

- Mansbridge R.J., Blake J.S., 1997. Nutritional factors affecting the fatty acid composition of bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 78:37-47.
- McCarthy M.M., Mann S., Nydam D.V., Overton T.R., McArt J.A., 2015. Short communication: Concentration of non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate in dairy cows are not well correlated during the transition period. *Journal of Dairy Science*, 98:6284-6290.
- McArt J.A., Nydam D.V., Oetzel G.R., 2012. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 95(9):5056–5066.
- McArt J.A.A., Nydam D.V., Oetzel G.R., Overton T.R., Ospina P.A., 2013. Elevated non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *Veterinary Journal*, 198:560–570.
- Mc Gavin D., Zachary J., 2007. *Pathologic basis of veterinarianian disease*. Elsevier, 8:115-158.
- McPherson P.A., McEneny J., 2012. The biochemistry of ketogenesis and its role in weight management, neurological disease and oxidative stress. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 68(1):141–151.
- Ménard L., Thompson A., 2007. Milk fever and alert downer cows: does hypophosphatemia affect the treatment response? *Canadian Veterinary Journal*, 48:487-4919.
- Moorby J.M., Dewhurst R.J., Tweed J.K.S., Dhanoa M.S., Beck N.F.G., 2000. Effects of altering the energy and protein supply to dairy cows during the dry period. 2. Metabolic and hormonal responses. *Journal of Dairy Science*, 83:1795–805.
- Murondoti A., Jorritsma R., Beynen A.C., Wensing T., Geelen M.J., 2004. Unrestricted feed intake during the dry period impairs the postpartum oxidation and synthesis of fatty acids in the liver of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87(3):672–679.

- Nakagawa H., Katoh N., 1998. Reduced Activity of Lecithin:Cholesterol Acyltransferase in the Serum of Cows with Ketosis and Left Displacement of the Abomasum. *Veterinary Research Communications* 22(8): 517–524.
- Oetzel G. R., 2004. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 20:651–674.
- Oliver S.P., Sordillo L.M., 1988. Udder health in the periparturient period. *Journal of Dairy Science*, 71(9):2584-606.
- Ospina, P. A., D. V. Nydam, T. Stokol, and T. R. Overton, 2010. Evaluation of nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science*, 93(2):546–554.
- Overton T.R. and Waldron M.R., 2004. Nutritional management of transition dairy cows: Strategies to optimize metabolic health. *Journal of Dairy Science*, 87(1):E105-E119.
- Paape, M.I., Bannerman, D.D., Zhao, X., Lee, J.W., 2003. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. *Veterinary Research*. 34, 597–627.
- Palmquist D.L., Beaulieu A.D., Barbano D.M., 1993. Feed and animal factors influencing milk-fat composition. *Journal of Dairy Science*, 76:1753–1771.
- Pancioli N., 2013. Strategie alimentari atte a incrementare il contenuto di omega3 e cla del latte. Relatore Formigoni R., Dipartimento Scienze degli alimenti, nutrizione animale e sicurezza alimentare. Università di Bologna.
- Park A.F., Shirley J.E., DeFrain J.M., Titgemeyer E.C., Ferdinand E.E., Cochran R.C., Schmidt D.G., Ives S.E., Nagaraja T.G., 2001. Changes in rumen capacity during the periparturient period in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84(1): 47-51.

- Partiseti M., Deist F.L., Hivroz C., Fisher A., Korn H., Choquet D., 1994. The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 269:32327–32335.
- Patterson R. E., Ducrocq A. J., McDougall D. J., Garrett T. J., Yost R.A., 2015. Comparison of blood plasma sample preparation methods for combined LC-MS lipidomics and metabolomics. *Journal of Chromatography B*, 1002:260–266.
- Poulton P.J., 2014. Proceedings of XXVIII World Buiatrics Congress, 212-218.
- Pushpakumara P.G., Gardner N.H., Reynolds C.K., Beever D.E., Wathes D.C., 2003. Relationships between transition period diet, metabolic parameters and fertility in lactating dairy cows. *Theriogenology* (60):1165–1185.
- Quiroz-Rocha G. F., LeBlanc S., Duffield T., Wood D., Leslie K. E., Jacobs R. M., 2009. Evaluation of prepartum serum cholesterol and fatty acids concentrations as predictors of postpartum retention of the placenta in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(6):790–793.
- Raboisson D., Mounie M., Maigne E., 2014. Diseases, reproductive performance, and changes in milk production associated with subclinical ketosis in dairy cows: A metaanalysis and review. *Journal of Dairy Science*, 97(12):7547-63.
- Radloff H. D., Schultz L. H., Hoekstra W. G., 1966. Relationship of Plasma Free Fatty Acids to Other Blood Components in Ruminants under Various Physiological Conditions. *Journal of Dairy Science*, 49(2):179–182.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchliff, K.W., 2000. *Veterinary Medicine*. WB. Sannders, 7:106-107.

- Reid I.M., Roberts C.J., Treacher R.J. and Williams L.A., 1986. Effect of body condition at calving on tissue mobilization, development of fatty liver and blood chemistry of dairy cows. *Animal Science*, 43(1):7-15.
- Reinhardt T.A., Lippolis J.D., McCluskey B.J., Goff J.P., Horst R.L., 2011, Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Veterinary Journal*, 188:122-124.
- Richieri G.V. and Kleinfeld A.M., 1995. Unbound free fatty acid levels in human serum. *The Journal of Lipid Research*, 36:229-240.
- Rukkwamsuk T., Kruip T.A.M., Wensing T., 1999. Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Veterinary Quarterly*, 21:71–77.
- Rukkwamsuk T., Geelen M.J.H., Kruip T.A.M., Wensing T., 2000. Interrelation of fatty acid composition in adipose tissue, serum, and liver of dairy cows during the development of fatty liver postpartum. *Journal of Dairy Science*, 83:52–59.
- Rutkowska J., Bialek M., Bagnicka E., Jarczak J., Tambor K., Strzalkowska N., Jozwik A., Krzyzewski J., Adamska A., Rutkowska E., 2015. Effects of replacing extracted soybean meal with rapeseed cake in corn grass silage-based diet for dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 82:161–168.
- Sánchez-Juanes F., Alonso J.M., Zancada L., Hueso P., 2009. Distribution and fatty acid content of phospholipids from bovine milk and bovine milk fat globule membranes. *International Dairy Journal*, 19(5): 273-278.
- Samková E., 2011. Factors Affecting Fatty Acid Composition of Cow's Milk Fat. Doctoral Thesis, University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Agriculture, České Budějovice, Czech Republic, p.60.
- Santiago M., Strobel S., 2013. *Thin Layer Chromatography*. 1st edition. New Haven, Connecticut. © Elsevier Inc, cap 24 pp. 303- 323.

- Schaff C., Borner S., Hacke S., Kautzsch U., Sauerwein H., Spach-mann S.K., Schweigel-Rontgen M., Hammon H.M., Kuhla B., 2013. Increased muscle fatty acid oxidation in dairy cows with intensive body fat mobilization during early lactation. *Journal of Dairy Science*. 96(10):6449–6460.
- Schwingshackl L., Hoffmann G., 2012. Monounsaturated Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease: Synopsis of the Evidence Available from Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Nutrients*, 4(12): 1989–2007.
- Sejrsen K., Břrn T., Jensen S.K., 2007. Prospects of obtaining favourable fatty acid composition of cows milk by feeding. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 16:7-20.
- Sheldon I. and Owens S.E., 2017. Postpartum uterine infection and endometritis in dairy cattle. *Animal Reproduction*, 14:622-629.
- Shingfield K.J. and Griinari J.M., 2007 – Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109:799-816.
- Shingfield K.J., Chilliard Y., Toivonen V., Kairenius P., Givens D.I., 2008. Trans fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 606:3–65.
- Siliprandi, Tettamanti G., 2014. *Biochimica medica*, 4 ht edizione, Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova, pp 321-380.
- Simianer H., Sobu H., Schaeffer L.R., 1991. Estimated genetic correlations between disease and yield traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 74:43-58.
- Simonew K. and Wondu M., 2013. Transition period and immunosopression: critical period of dairy cattle reproduction. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, 5(2): 44-57, 2013
- Smith, G.S., 2000. Neutrophils. In: Feldman B.F., Zinkl J.G., Jain N.C., Schalm's Veterinary Hematology. Lippincott Williams & Wilking, Philadelphia, (6)281–296.

- Sordillo L.M., Weaver J.A., Cao Y.Z., Corl C., Sylte M.J., Mullarky I.K., 2005. Enhanced 15-HPETE production during oxidant stress induces apoptosis of endothelial cells. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 76:19–34.
- Sordillo L.M. and Aitken S.L., 2009. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128:104–109.
- Stádník L., Ducháček J., Okrouhlá M., Ptáček M., Beran J., Stupka R., Zita L., 2013. The effect of parity on the proportion of important healthy fatty acids in raw milk of Holstein cows. *Mljekarstvo*, 63:195–202.
- Strzałkowska N., Jóźwik A., Bagnicka E., Horbańczuk J.O., Krzyżewski J., 2009 – Studies upon genetic and environmental factors affecting the cholesterol content of cow milk. I. Relationship between the polymorphic form of beta-lactoglobulin, somatic cell count, cow age and stage of lactation and cholesterol content of milk. *Animal Science Papers and Reports*, 27(2):95-103.
- Stull C.L., Payne M.A., Berry S.L., Reynolds J.P., 2007. A review of the causes, prevention, and welfare of nonambulatory cattle. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 231:227-234.
- Tucho T.T. and Ahmed W.M., 2017. Economic and Reproductive Impacts of Retained Placenta in Dairy Cows. *Journal of Reproduction and Infertility*, 8(1): 18-27.
- Turner M.L., Cronin J.G., Noleto P.G., Sheldon I.M., 2016. Glucose availability and AMP-activated protein kinase link energy metabolism and innate immunity in the bovine endometrium. *PLOS One*, 11:e0151416.
- Turk R., Podpečan O., Mrkun J., Kosec M., Flegar-Meštrić Z., Perkov S., Starič J., Robić M., Belić M., Zrimšek P., 2013. Lipid mobilisation and oxidative stress as metabolic adaptation processes in dairy heifers during transition period. *Animal Reproduction Science*, 141:109–115.



- Useni B.A., Muller C.J.C., Cruywagen C.W., 2018. Pre- and postpartum effects of starch and fat in dairy cows: A review. *South African Journal Animal Science*, 48:413–426.
- Van der Drift S.G.A., Jorritsma R., Schonewille J., Knijn H., Stegeman A., 2012. Routine detection of hyperketonemia in dairy cows using Fourier transform infrared spectroscopy analysis of  $\beta$ -hydroxybutyrate and acetone in milk in combination with test-day information. *Journal of dairy science*. 95. 4886-98.
- Van Haelst Y.N., Beeckman A., Van Kneegsel A.T., Fievez V., 2008. Short communication: elevated concentrations of oleic acid and long-chain fatty acids in milk fat of multiparous subclinical ketotic cows. *Journal of Dairy Science*, 91(12):4683–4686.
- Van Kneegsel A.T., van den Brand H., Dijkstra J., Tamminga S., Kemp B., 2005. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 45(6):665–688.
- Van Winden S.C.L., Kuiper R., 2003. Left displacement of the abomasum in dairy cattle: recent developments in epidemiological and etiological aspects. *EDP Sciences*, 34:47–56.
- Van Winden SC, Jorritsma R, Muller KE, Noordhuizen JP. Feed intake, milk yield and metabolic parameters prior to left displaced abomasums in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2003; 86:1465–1471.
- Vlaeminck B., Fievez V., Demeyer D., Dewhurst R.J., 2006. Effect of forage:concentrate ratio on fatty acid composition of rumen bacteria isolated from ruminal and duodenal digesta. *Journal of Dairy Science*, 89:2668–2678.
- Vranković L., Aladrović J., Octenjak D., Bijelić D. Cvetnić L., Stojević Z., 2017. Milk fatty acid composition as an indicator of energy status in Holstein dairy cows. *Archives Animal Breeding*, 60:205–212.
- Youngquist R.S. and Threlfall W.R., 2007. *Current Therapy in large Animal Theriogenology*, 2nd ed., Saunders, and imprint of Elsevier Inc, USA.

- Yu, Z.T., 2012. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of rumen microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 78:4271–4280.
- Wall R., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Stanton C., 2010. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Reviews*, 68(5): 280–289.
- Weiss W.P., and Gonzalo F., 2006. Are your cows getting the vitamin they need? *Proceedings of West Canadian Dairy Seminar. Advances in Dairy Technology*, 18:249-259.
- Wilde, D., 2006. Influence of macro and micro minerals in the periparturient period on fertility in dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, 96:240–249.
- Wittrock J.M., Proucifoot K.L., Weary D.M., Von Keyserlingk M.A.G., 2011. Short communication: metritis affects milk production and cup rate of Hosten multiparous cows differently. *Journal of Dairy Science*, 94:2408-2412.
- Zarrin M., Grossen-Rosti L., Bruckmaier R.M., Gross J.J., 2017. Elevation of blood b-hydroxybutyrate concentration affects glucose metabolism in dairy cows before and after parturition. *Journal of Dairy Science*, 100(3):2323–2333.
- Zarrin M., De Matteis L., Vernay M.C., Wellnitz O., van Dorland H.A., Bruckmaier R.M., 2013. Long-term elevation of b-hydroxybutyrate in dairy cows through infusion: effects on feed intake, milk production, and metabolism. *Journal of Dairy Science*, 96(5):2960–2972.
- Zarrin M., Wellnitz O., van Dorland H.A., Bruckmaier R.M., 2014. Induced hyperketonemia affects the mammary immune response during lipopolysaccharide challenge in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(1):330–339.
- Zarrin M., Wellnitz O., van Dorland H.A., Gross J.J., Bruckmaier R.M., 2014. Hyperketonemia during lipopolysaccharide induced mastitis affects systemic and local intramammary metabolism in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(6):3531–3541.

Zychlinsky A., Weinrauch Y., Weiss, J., 2003. Introduction: forum in immunology on neutrophils.  
Microbes Infection, 5:1289–1291.

## RINGRAZIAMENTI