



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**  
**DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN**  
**MEDICINA VETERINARIA**

**Principali patologie metaboliche della bovina da latte:  
valutazione dell'effetto di protocolli di prevenzione a base di  
acetil-metionina, inositolo, cianocobalamina, alanina, arginina,  
treonina, glutammina e acido  $\alpha$ -lipoico**

**Relatore**

Prof. Enrico Fiore

**Correlatore**

Dott.ssa Anastasia Lisuzzo

**Laureanda**

Francesca Cecchini

**Matricola n.**

1207096

ANNO ACCADEMICO 2022/2023



# Sommario

<b>Abstract</b> .....	1
<b>Riassunto</b> .....	3
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	5
1.1. Il periodo di transizione .....	5
1.1. Cambiamenti ormonali durante il periodo di transizione .....	6
1.2. Bilancio energetico negativo.....	8
1.3. Milk fever .....	10
1.4. Sindrome della vacca a terra.....	13
1.5. La dislocazione dell'abomaso.....	16
1.6. Ritenzione di placenta.....	18
1.7. Le metriti.....	19
1.8. Lipidosi epatica.....	21
1.9. Chetosi.....	24
1.10. Terapia per la chetosi .....	27
1.11. Prevenzione della chetosi .....	28
1.12. Costo della chetosi.....	30
<b>2. OBIETTIVI DELLA TESI</b> .....	31
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	32
3.1. Azienda e animali .....	32
3.2. Protocollo sperimentale.....	33
3.3. Analisi di laboratorio dei campioni ematici .....	34
3.4. Analisi statistica.....	34
<b>4. RISULTATI</b> .....	35
4.1. Analisi laboratoristiche .....	35
4.2. Parametri e rilievi clinici.....	49
<b>5. DISCUSSIONE</b> .....	50
5.1. Profilo energetico.....	50
5.2. Profilo epatico .....	52
5.3. Profilo metabolico proteico .....	53
5.4. Profilo minerale.....	55
5.5. Parametri e rilievi clinici.....	57
<b>6. CONCLUSIONI</b> .....	59
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	60



## Acronimi ed abbreviazioni

ALP: *Alkaline phosphatase*, fosfatasi alcalina

ALT: *Alanine aminotransferase*, alanina aminotransferasi

AST: *Aspartate aminotransferase*, aspartato aminotransferasi

BCS: *Body condition score*, punteggio della condizione corporea

BHB: *β-hydroxybutyrate*, β-idrossibutirrato

BT: Bilirubina totale

BW: *Body weight*, peso corporeo

CK o CPK: *Creatine kinase*, creatinchinasi o *creatine phosphokinase*, creatinfosfochinasi

CMP: Gruppo con protocollo preventivo completo

CTRL: Gruppo di controllo

DCAD: *Dietary anion cation difference*, differenza tra cationi e anioni nella dieta

DMI: *Daily matter intake*, assunzione giornaliera di sostanza

EBal: *Energy balance*, bilancio energetico

FGF23: *Fibroblast growth factor 23*, fattore di crescita dei fibroblasti 23

GGT: *γ-glutamyl transferase*, gamma-glutamyl transferasi

GH: *Growth hormone*, ormone della crescita

IGF: *Insulin-like growth factor*, ormone di crescita insulino simile

LDA: *Left displaced abomasum*, dislocazione abomasale sinistra

LDH: *Lactate dehydrogenase*, lattato deidrogenasi

NEB: *Negative energy balance*, bilancio energetico negativo

NEFA: *Non-esterified fatty acid*, acidi grassi non esterificati

NSAIDs o FANS: *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, farmaci antinfiammatori non steroidei

PR: *Pregnancy rate*, tasso di concepimento

PT: Proteine totali

PTH: *Parathyroid hormone*, ormone paratiroideo

RDA: *Right displaced abomasum*, dislocazione abomasale destra

ROS: *Reactive oxygen species*, specie reattive dell'ossigeno

SMP: Gruppo con protocollo preventivo semplificato

TC: *Total cholesterol*, colesterolo totale

TG: Trigliceridi

VLDL: *Very-low density lipoprotein*, lipoproteine a bassa densità



## Abstract

During the transition period there is an increase in the demand for nutrients and energy; this leads the dairy cow in a condition of NEB that predisposes her to an increased risk of metabolic and non-metabolic pathologies, including ketosis. This is characterized by an increase in the production of ketone bodies, a lower milk production a variable symptomatology. There are several therapies for ketosis, but it's possible to work in prevention.

The object of this study is to compare the effects of two preventive protocols on blood parameters, production parameters and clinical findings. The two preventive protocols consist of: a complete preventive treatment and a simplified preventive treatment.

The trial took place in a dairy farm, with 150 Friesian cows. The animals were selected at the beginning of the dry period and randomly assigned to three groups: control (CTRL, without prior protocol), second group (CMP, treated with a compound based on acetyl-methionine, inositol, cyanocobalamin, alanine, arginine, threonine and glutamine and a compound based on acetyl methionine, cyanocobalamin and  $\alpha$ -lipoic acid, with 9 total administration) and third group (SMP, treated simultaneously with the two compounds of the complete protocol, with 2 total administration). Blood samples were collected 2 times in prepartum, at calving and 4 times in postpartum. Glucose, NEFA, BHB, TG, CT, ALT, AST, GGT, LDH, BT, albumin, PT, creatinine, CPK, ALP, calcium, magnesium, potassium, sodium and chlorine were analysed.

The parameters were analysed using the MIXED PROC procedure: treatment, sampling time and parity were used as fixed factors, and the animal was used as a random and repeated factor.

The two preventive protocols, without distinction, have led to the improvement of: glucose, NEFA, BHB, AST, CPK, ALP, potassium, sodium and chlorine with respective p-values of 0.013, 0.032, 0.027, 0.010, 0.062, 0.004, 0.092, 0.036 and 0.025. The CMP protocol improved more than SMP and CTRL: phospholipids, GGT, albumin up to T3, creatinine, calcium and magnesium with respective p-values of 0.047, 0.0, 0.04, 0.093, 0.36 and 0.81. The SMP protocol improved more than CMP and CTRL: LDH, albumin after T3 and urea with respective p-values of 0.018, 0.04 and 0.009. TG, CT, ALT, BT concentrations have not improved with protocols ( $p > 0.05$ ). In the production and clinical surveys, the CMP protocol resulted in an increased production of colostrum and BRIX index; the incidence of ketosis, mastitis and metritis was the lowest in CMP, while SMP had the lowest incidence of placental retention and laminitis. The CMP protocol has been found to be better in the prevention of ketosis and other pathologies of the transition period.





## Riassunto

Durante il periodo di transizione è presente un aumento delle richieste di nutrienti ed energia; questo conduce la bovina da latte in una condizione di NEB che predispone ad un maggiore rischio di patologie metaboliche e non, tra cui la chetosi. Questa è caratterizzata da un aumento della produzione dei corpi chetonici, una minore produzione di latte e una sintomatologia variabile. Esistono diverse terapie per la chetosi, ma è possibile lavorare in prevenzione.

L'oggetto di questo studio è comparare gli effetti di due protocolli preventivi su glucosio, BHB e NEFA, parametri biochimici, parametri produttivi e rilievi clinici. I due protocolli preventivi sono costituiti da: un trattamento preventivo completo (CMP) ed uno semplificato (SMP).

La prova si è svolta in un allevamento di bovine da latte ad alta produzione, con 150 bovine di razza Frisone. Gli animali sono stati selezionati all'inizio dell'asciutta e assegnati casualmente a tre gruppi: di controllo (CTRL, senza protocollo preventivo), secondo gruppo (CMP, trattati con un composto a base di acetil-metionina, inositolo, cianocobalamina, alanina, arginina, treonina e glutammina e un composto a base di acetil-metionina, cianocobalamina e acido  $\alpha$ -lipoico, con 9 somministrazioni totali) e terzo gruppo (SMP, trattati simultaneamente con i due composti del protocollo completo, con 2 somministrazioni totali). I campioni di sangue sono stati raccolti a 2 volte in preparto, al parto e 4 volte in post-parto. È stata effettuata un'analisi di glucosio, NEFA, BHB, TG, CT, ALT, AST, GGT, LDH, BT, albumina, PT, creatinina, CPK, ALP, calcio, magnesio, potassio, sodio e cloro.

I parametri sono stati analizzati con procedura PROC MIXED: come fattori fissi il trattamento, il tempo di campionamento e l'ordine di parto, e come fattore randomico e ripetuto l'animale.

I due protocolli preventivi, senza distinzione, hanno portato al miglioramento di: glucosio, NEFA, BHB, AST, CPK, ALP, potassio, sodio e cloro con rispettivi p-values di 0.013, 0.032, 0.027, 0.010, 0.062, 0.004, 0.092, 0.036 e 0.025. Il protocollo CMP ha migliorato maggiormente rispetto a SMP e CTRL: fosfolipidi, GGT, albumina fino a T3, creatinina, calcio e magnesio con rispettivi p-values di 0.047, 0.0, 0.04, 0.093, 0.36 e 0.81. Il protocollo SMP ha invece migliorato maggiormente rispetto a CMP e CTRL: LDH, albumina in seguito a T3 e urea con rispettivi p-values di 0.018, 0.04 and 0.009. Le concentrazioni di TG, CT, ALT, BT non sono migliorate con i protocolli ( $p > 0.05$ ). Nei rilievi produttivi e clinici il protocollo CMP è risultato in una produzione di colostro e un indice BRIX maggiori; l'incidenza di chetosi, mastite e metrite è stata la più bassa in CMP, mentre SMP ha avuto l'incidenza minore di ritenzione placentare e laminite. Il protocollo CMP è risultato migliore nella prevenzione della chetosi e di altre patologie del periodo di transizione.



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. Il periodo di transizione

Il periodo di transizione è definito come l'intervallo di tempo che inizia tre settimane prima del parto e finisce tre settimane dopo il parto (Drackley, 1999). La bovina da latte subisce improvvisi cambiamenti nelle funzioni metaboliche ed immunitarie, che si associano ad una maggiore incidenza di malattie:

- disordini correlati al metabolismo energetico: lipidosi epatica, chetosi e acidosi ruminale acuta e subacuta;
- disordini correlati al metabolismo dei minerali: collasso puerperale, ipocalcemia subclinica ed edema della mammella;
- problemi correlati al sistema immunitario: ritenzione di placenta, metrite e mastite (Block, 2010).

Le conseguenze di queste patologie possono essere una riduzione della produzione di latte, una sua composizione alterata, una riduzione delle performance riproduttive, riduzione dell'aspettativa di vita e l'aumento dei costi (Hailemariam et al., 2014), che può arrivare anche ad essere di 280\$ per un caso singolo di iperchetonemia (McArt et al., 2015); un impatto importante considerato che dal 30 al 50% di vacche sono affette da qualche forma di malattia metabolica o infettiva durante il periodo precedente e successivo al parto (Leblanc, 2010). È per questo motivo che una diagnosi precoce aiuta a ridurre l'incidenza di queste malattie e le perdite economiche associate (Hailemariam et al., 2014), che per esempio nell'industria canadese si stimano essere di 200 milioni di dollari all'anno (Ametaj et al, 2012).

“There is no other time in a cow's life that is more tumultuous than the transition from late gestation to early lactation.” (Grummer et al., 2004). Infatti, c'è un aumento nella richiesta di nutrienti nella vacca in post-parto, dovuto al rapido aumento di produzione di latte; per soddisfare la richiesta vi sono due principali meccanismi di regolazione del metabolismo: omeostasi e omeoresi. (Martens, 2020). Il controllo omeostatico implica il mantenimento di un equilibrio fisiologico o condizioni costanti nell'ambiente interno all'organismo; invece, l'omeoresi è definita come i cambiamenti coordinati nel metabolismo per supportare uno stato fisiologico dominante, come la gravidanza. Infatti, la gestazione, nella sua parte finale richiede all'animale gravido circa il 75% di nutrienti in più rispetto ad un animale non gravido dello stesso peso. Nutrienti che principalmente servono per lo

sviluppo del feto, la crescita delle membrane fetali, l'utero gravido e lo sviluppo della ghiandola mammaria (Bauman and Currie, 1980).

La richiesta di nutrienti non è assolta dall'assunzione giornaliera di sostanza (DMI) della vacca in transizione, che da 5 a 7 giorni preparto tende a diminuire del 30% (Grant and Albright, 1995), con un DMI medio su peso dell'animale (BW) di 1,69% e 1,88%, rispettivamente per manze e vacche, nelle ultime 3 settimane di gestazione (Hayirli et al., 2002). La variazione di DMI è associata a diversi fattori: legati all'animale (età, punteggio della condizione corporea o BCS, razza, stato fisiologico e livello di produzione latte), dietetici (ingredienti e composizione nutritiva dell'alimento e caratteristiche agronomiche e fisiche del mangime), manageriali (tipo di produzione, mangime e stabulazione) e climatici (temperatura, umidità e ventilazione) (Hayirli et al., 2002). Ma la causa principale di diminuzione del DMI è attribuita alla rapida crescita e l'aumento di peso del feto, che negli ultimi due mesi accumula il 60% del peso alla nascita (Tao and Dahl, 2013); quest'ultimo occupa spazio nella cavità addominale, riducendo il volume del rumine (Jouany, 2006). La critica diminuzione del DMI, associata alla produzione di latte e gli adattamenti nutrizionali richiesti inducono uno stato di bilancio energetico negativo (NEB) (Esposito et al., 2014).

Una condizione di NEB porta ad un aumento di specifici metaboliti nel sangue, quali acidi grassi non esterificati (NEFA) e  $\beta$ -idrossibutirrato (BHB). La presenza di questi metaboliti è correlata alla maggiore incidenza di taluni patologie, quali la dislocazione dell'abomaso e la chetosi clinica, ad una diminuzione del tasso di concepimento (PR) e una diminuzione della produzione latte (Ospina et al., 2010). Come tale, la gestione dell'animale e della nutrizione durante il periodo di transizione risultano di fondamentale importanza per il successo della futura lattazione (Duffield et al., 2009; Chapinal et al., 2012).

## 1.1. Cambiamenti ormonali durante il periodo di transizione

L'organismo, per supportare la lattazione e rispondere alle richieste metaboliche in presenza di un bilancio energetico negativo effettua un cambiamento nel metabolismo dei nutrienti ed entra in uno stato catabolico costituito da: mobilizzazione e utilizzo delle proteine muscolari, glicogenolisi epatica e lipolisi del tessuto adiposo (Block, 2010). Questi cambiamenti si trovano sotto controllo ormonale (Goff and Horst, 1997).

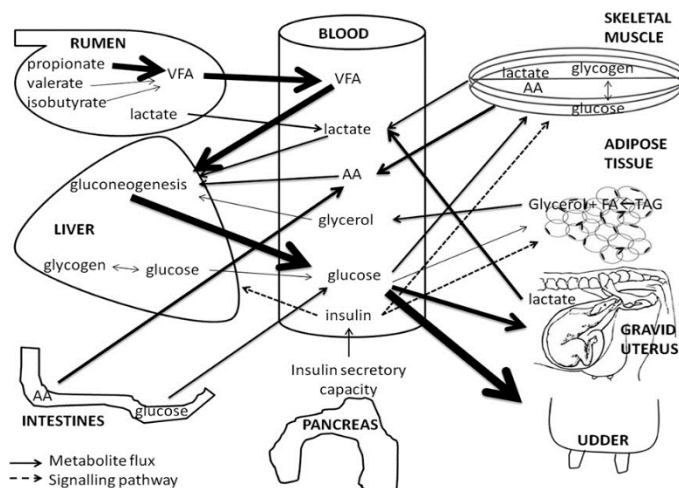
In particolare, l'insulina svolge un ruolo principale, in quanto durante il periodo di transizione la bovina entra in uno stato di insulino-resistenza (De Koster and Opsomer, 2013); questa è definita come uno stato in cui normali concentrazioni di insulina producono una risposta biologica ad essa

al di sotto del normale (Kahn, 1978). È un adattamento omeoretico che permette di fornire un adeguato apporto di glucosio all'utero gravido e alla ghiandola mammaria. Infatti, quest'ultimi richiedono rispettivamente un apporto di glucosio di 0.10 mmol/kg di feto al giorno e di 0,4 mmol/kg di latte, da sommarsi al requisito di base di 1.57 mmol/d (De Koster and Opsomer, 2013). La ghiandola mammaria, inoltre dipende dall'uptake di glucosio del sangue in quanto non può sintetizzarlo dai suoi precursori per la mancanza dell'enzima glucosio-6-fosfatasi (Zhao and Keating, 2007).

Il meccanismo di insulino-resistenza si esprime attraverso: una diminuzione della produzione di insulina e/o un aumento della sua degradazione; un'alterazione dell'interazione dell'insulina con i suoi recettori, in particolare una diminuzione di questi e una diminuzione dell'affinità di legame; anomalie nella segnalazione intracellulare e la traslocazione dei recettori per il glucosio (GLUT) (Hayirli, 2006).

Nel tessuto adiposo e scheletrico, i recettori GLUT4 sono responsabili dell'uptake di glucosio stimolato dall'insulina; il contenuto di GLUT4 tende a ridursi del 60% alla quarta settimana di lattazione rispetto al periodo di asciutta (Kuhla et al., 2011), tale da diminuire il consumo di glucosio da parte di questi tessuti (De Koster and Opsomer, 2013). Il tessuto placentare presenta diversi tipi di recettori GLUT: GLUT1, GLUT3, GLUT5 e GLUT4 (De Koster and Opsomer, 2013); nonostante ciò non è stato dimostrato ancora che l'insulina stimoli l'uptake di glucosio nella placenta (Lucy et al., 2012). Anche il tessuto mammario presenta diversi recettori GLUT, tra i quali il più importanti risulta essere GLUT1, mentre risulta assente il recettore GLUT4, che dimostra come la ghiandola mammaria non sia dipendente dall'azione dell'insulina (Komatsu et al., 2005).

**Figura 1:** metabolismo del glucosio nei ruminanti. Lo spessore delle frecce indica l'importanza della via metabolica. L'apporto di glucosio è favorito dall'assorbimento intestinale, ridotto nei ruminanti, e dalla gluconeogenesi epatica che avviene a partire da diversi precursori: il proprionato (acido grasso volatile o VFA: *volatile fatty acid*) è il precursore glucogenico più importante poiché fornisce dal 60% al 74% di glucosio; a seguire, in ordine di importanza: lattato, alanina, valerato e isobutirrato, glicerolo e altri amminoacidi. L'utero gravido e la ghiandola mammaria sono i due più grandi consumatori di glucosio nel periodo di transizione.



De Koster & Opsomer, 2013

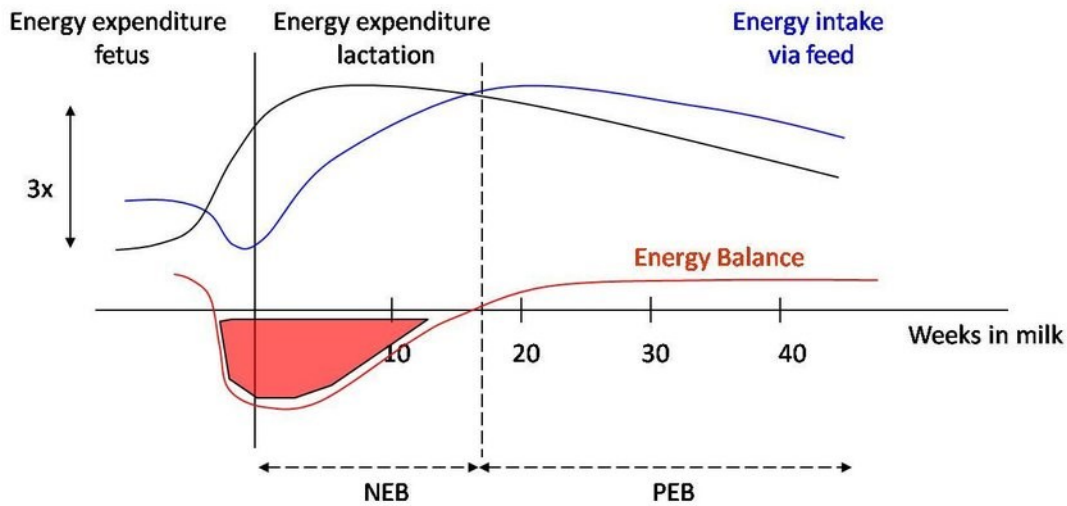
Oltre alla condizione di insulino-resistenza, nel post-parto vi è diminuzione della concentrazione di insulina (Kahn, 1978); quindi il metabolismo di carboidrati, proteine e grassi viene alterato: avremo un aumento della gluconeogenesi e della glicogenolisi, una riduzione della sintesi proteica, un aumento della lipolisi, diminuzione della lipogenesi. In questo modo, il glucosio e gli aminoacidi vengono reindirizzati alla ghiandola mammaria, e si ha un aumento dei NEFA, derivanti dalla lipolisi e lipomobilizzazione, che vengono utilizzati a livello epatico come substrato energetico (De Koster and Opsomer, 2013).

In tarda gestazione, la bovina da latte si trova in uno stato anabolico: il profilo endocrino è caratterizzato da alte concentrazioni di insulina e fattore di crescita simile all'insulina (IGF-1) e basse concentrazioni di ormone della crescita (GH); in seguito al parto, il profilo endocrino cambia favorendo un metabolismo catabolico: la secrezione di GH aumenta, mentre l'insulina e l'IGF-1 diminuiscono (Ronge et al., 1988). L'aumento del rapporto GH: insulina nel sangue favorisce la lipomobilizzazione, incrementando la quantità di NEFA nel sangue, nel tentativo di colmare il deficit energetico a cui va incontro la bovina dopo il parto (Drackley et al., 2005); inoltre il GH ha un effetto antagonizzante sull'uptake di glucosio insulino-dipendente e attenua l'abilità dell'insulina di diminuire la gluconeogenesi (Kim, 2014).

## 1.2. Bilancio energetico negativo

Il bilancio energetico totale dell'animale (EBal) è la differenza tra l'energia consumata con l'alimento e l'energia usata per il mantenimento e/o la produzione (di latte, carne etc.) (Baumgard et al., 2006). Durante gli ultimi 60 giorni di gravidanza i requisiti per la gravidanza rimangono pressoché costanti (NRC, 2001), ciò che altera il bilancio energetico della bovina è il declino del DMI, che durante le ultime 3 settimane di gestazione causa l'instaurarsi di un bilancio energetico negativo (Hayirli and Grummer, 2004). Questo tende ad aggravarsi nelle prime settimane di lattazione perché la produzione di latte cresce ad un tasso maggior rispetto alla crescita del DMI, con picchi rispettivamente da 5 a 8 settimane e da 12 a 15 settimane post-parto (Coppock, 1985). Il valore di NEB più basso si registra tra i 2 e 12 giorni post-parto e la condizione perdura approssimativamente fino al 72esimo giorno di lattazione (Jorritsma et al., 2003).

**Figura 2:** Relazione tra assunzione energetica attraverso il mangime (*energy intake via feed* - linea blu), spesa energetica per il feto e la lattazione (*energy expenditure fetus and lactation* - linea nera) che forniscono il bilancio energetico (*energy balance* - linea rossa) durante il ciclo riproduttivo della bovina da latte.



Bossaert et al., 2009

All'inizio della lattazione, vi è una grande richiesta di glucosio per la lattazione; questo associato alla diminuzione del DMI porta la bovina ad entrare in uno stato di ipoglicemia: i valori di glucosio tendono a calare drasticamente dopo il parto fino a raggiungere un minimo durante il periodo tra la prima e la terza settimana di lattazione (Ingvarsen and Andersen, 2000). La riduzione dei livelli di glucosio porta a dei livelli di insulina circolanti minori che promuovono la mobilizzazione dei grassi tramite lipolisi; infatti, durante il periodo di NEB, il tessuto adiposo rappresenta la fonte energetica maggiore per la bovina (Sordillo and Raphael, 2013). La lipomobilizzazione provvede a fornire l'energia per la produzione di latte, ma quando questa non è adeguatamente regolata (Sordillo and Raphael, 2013), può portare ad accumulo di elevate concentrazioni di NEFA; quest'ultimi sono correlati con diverse patologie metaboliche che si possono sviluppare nella vacca in transizione. I valori critici di NEFA risultano essere:  $\geq 0,3$  mEq/L dai 14 ai 2 giorni preparto e  $\geq 0,6$  mEq/L dai 3 ai 14 giorni post-parto; elevate concentrazioni di NEFA risultano associati a patologie come la dislocazione abomasale, chetosi clinica, metrite e ritenzione di placenta (Ospina et al., 2010). Il tasso di lipomobilizzazione tende ad essere maggiore le bovine che si presentano al parto con un BCS  $\geq 3.5$  (su una scala da 1 a 5), poiché possiedono una maggiore massa di tessuto adiposo (Sordillo and Raphael, 2013); in un animale obeso, i NEFA, presenti ad elevata concentrazione possono portare gli adipociti ad essere maggiormente resistenti all'azione dell'insulina, implicando una maggiore lipolisi, lipomobilizzazione (Pires et al., 2007) e un maggiore rischio per lo sviluppo di patologie metaboliche (Sordillo and Raphael, 2013).

I NEFA, nel fegato vengono metabolizzati per produrre energia attraverso la  $\beta$ -ossidazione; il risultato è la produzione di corpi chetonici: BHB, acetoacetato e acetone (Engelking, 2015). Elevate concentrazioni di BHB sono associati ad una funzione immunitaria alterata: il numero di neutrofili risulta essere minore e le loro funzioni fagocitarie e battericide tendono ad essere ridotte (Suriyasathaporn et al., 2000). Pertanto, la condizione di NEB espone l'animale ad un maggiore rischio per lo sviluppo di patologie infettive, come mastiti o metriti (Sordillo and Raphael, 2013). La presenza di NEB può infine provocare conseguenze sulla ciclicità della animale, causando aumento del tempo fino al primo tentativo di inseminazione e riducendo il tasso di concepimento (Bourne et al., 2007; Wathes et al., 2007).

### 1.3. Milk fever

Il collasso puerperale è una malattia metabolica che avviene al o in vicinanza del parto, specialmente in vacche da latte ad alta produzione (Wathes et al., 2007). L'incidenza dell'ipocalcemia, o *milk fever*, in campo ha un range 0-10% sul totale della mandria, ma può arrivare al 25% nelle bovine partorienti (DeGaris and Lean, 2008). La subclinica, ancora più della precedente, ha un'incidenza durante il periodo di periparto che si avvicina al 50%. (Goff, 2008). Proprio per questo, risulta fondamentale definire l'ipocalcemia. Il valore fisiologico di calcio (Ca) nel sangue di una vacca è di 2.1 – 2.8 mmol/L (8,5-10 mg/dL), di cui il 50% è legato all'albumina e dal 42% al 48% invece è presente in forma ionizzata che risulta essere la forma biologicamente attiva (Goff, 2004); al sotto di questo abbiamo ipocalcemia che può essere subclinica, da 2 mmol/L fino a 1,5 mmol/L, e clinica <1,5 mmol/L (Reinhardt et al., 2011).

Il calcio plasmatico corrisponde all'1% del calcio totale contenuto nell'organismo; il resto è:

- 98% calcio mineralizzato nelle ossa con un pool labile di 0,5%, rapidamente scambiabile, e il restante di pool stabile;
- 1% tra calcio intracellulare e calcio extracellulare.

Considerando un animale di 600 kg di peso, sono presenti dai 7,8 ai 8,5 kg di calcio nello scheletro osseo, 3-3,5 g di calcio nel plasma, meno di 1 g in tutte le cellule dell'organismo e da 8 a 9 g in tutti i fluidi extracellulare al di fuori dell'osso (Goff, 2014).

Il metabolismo del calcio è principalmente regolato da due ormoni: ormone paratiroideo (PTH), prodotta dalle ghiandole paratiroidee, e 1,25-diidrossivitamina D (forma attiva della vitamina D), prodotta nel rene (Horst et al., 1994). Quest'ultima deriva dalla vitamina D, prodotta a livello della pelle o consumata nella dieta; questa viene poi idrossilata trasformandosi in 25-idrossivitamina D,



che entra nella circolazione e a livello dell'epitelio renale, se le cellule sono stimulate dal PTH, viene nuovamente idrossilata alla forma attiva 1,25-diidrossivitamina D (Reece, 2015).

Il pool plasmatico viene mantenuto in dall'animale tramite due vie di entrata principali: assorbimento intestinale e riassorbimento osseo. L'assorbimento avviene appunto nell'intestino (Horst, 1986), in particolare nel piccolo, ma anche in piccole quantità dai prestomaci (Chandler and Cragle, 1962). È inversamente proporzionale alla quantità di calcio contenuta nel mangime; quindi, se minore in quest'ultimo, l'assorbimento sarà maggiore (Horst, 1986). L'assorbimento può avvenire in maniera passiva o attiva. La prima consiste di una via paracellulare, vitamina-D-indipendente, che è utilizzata quando l'assunzione di calcio è adeguata o comunque alta (Bronner and Pansu, 1999); mentre la seconda è una via transcellulare vitamina-D-dipendente e con presenza di un carrier (Feldman et al., 2011). Il riassorbimento osseo, attivato mediante PTH (Goff, 2000), avviene tramite osteoclasti maturi, che si polarizzano sulla superficie ossea e acidificano un microambiente extracellulare tramite una pompa protonica elettrogenica. L'ambiente acido provoca la mobilizzazione della parte minerale dell'osso e successivamente la parte demineralizzata è degradata dalla catepsina K (Teitelbaum, 2000). Per aumentare il pool plasmatico di calcio il PTH, a livello renale, stimola il riassorbimento di calcio (Martín-Tereso and Verstegen, 2011).

Il pool si abbassa tramite escrezione con feci, urine e deposito nel tessuto osseo in animali non gravidi; in quelli gravidi e in lattazione c'è l'utilizzo da parte del feto e dalla ghiandola mammaria (Horst, 1986).

Nella tarda gestazione la richiesta di calcio è solo di 10 g di calcio al giorno (Mahen et al., 2018), ma la richiesta diventa successivamente imponente prima per produrre il colostro (contenente 1,7-2,3 g di Ca/kg) e poi il latte (contenente 1,1 g di Ca/kg), per cui è necessario prelevare dal pool plasmatico dai 20 a 30 g di calcio ogni giorno in lattazione precoce (Goff, 2004). Per fare fronte a queste richieste, vengono attivati i meccanismi di riassorbimento osseo e aumentato l'assorbimento intestinale, portando la vacca in uno stato di osteoporosi, con una perdita di tessuto osseo che raggiunge il 9-13% nel primo mese di lattazione, ma che è fondamentale per mantenere la normocalcemia. Ma nel momento in cui questi meccanismi non riescono a far fronte alle richieste, la vacca si ritrova inevitabilmente in uno stato di ipocalcemia e collasso puerperale (Goff, 2008).

I fattori di rischio per lo sviluppo del collasso puerperale sono: età, razza, dieta in parto, produzione di latte, presenza di altre patologie e casi pregressi di collasso puerperale. L'età fa diminuire la capacità di riassorbimento di calcio dall'osso (Van Mosel et al., 1993), il trasporto intestinale e il numero di recettori per la forma attivata della vitamina D (DeGaris and Lean, 2008;

Saborío-Montero et al., 2017); in questo modo il rischio di sviluppo di collasso puerperale può aumentare del 9% ad ogni lattazione.

Le razze più predisposte sono Jersey a Guernesey e minor misura la Swedish Red and White e la Norwegian Red (Smith et al., 2019); in particolare, bovine Jersey presentano un rischio 2,37 volte maggiore rispetto alle Frisone (Lean et al., 2006), probabilmente dovuto a una minore quantità di recettori per la vitamina D attivata (Goff et al., 1995) e una quantità maggiore di calcio contenuta nel colostro presente nelle Jersey (Saborío-Montero et al., 2017). Anche il BCS rappresenta un fattore di rischio (Constable et al., 2017), perché una vacca con  $BCS \geq 4$  presenta un rischio 3,3 volte maggiore di sviluppare ipocalcemia (Thilsing-Hansen et al., 2002).

Il fattore più importante di tutti è rappresentato dall'alimentazione preparto, in particolare la quantità di calcio, la quantità di fosforo e la differenza anioni-cationi contenuti nella dieta (DCAD) (Constable et al., 2017).

Fornire all'animale una quantità maggiore di 100 g di calcio nella dieta giornaliera aumenta il rischio di ipocalcemia (Jorgensen, 1974); un'elevata assunzione di calcio influenza l'assorbimento intestinale, diminuendolo proporzionalmente, e la mobilitazione di calcio dall'osso, la cui efficienza diminuisce perché il meccanismo omeostatico viene soppresso (DeGaris and Lean, 2008). Come conseguenza, al parto, la bovina richiede più tempo per attivare questi meccanismi ed è predisposta maggiormente all'ipocalcemia (Constable et al., 2017). Anche la quantità di fosforo nella dieta risulta importante perché il fosforo ematico aumenta di pari passi al suo contenuto nella dieta; un aumento ematico causa il rilascio del fattore di crescita fibroblastico (FGF23) che riduce il fosforo ematico e circolando nel sangue si lega ai suoi recettori renali, causando l'inibizione degli enzimi coinvolti nella sintesi di 1,25-diidrossivitamina D e aumentando la produzione degli enzimi che invece la degradano, causando così la riduzione dell'assorbimento intestinale di calcio (Smith et al., 2019). Inoltre, quando la quantità di potassio e di altri cationi come il sodio si presenta alta nella dieta, la bovina è soggetta ad un maggiore rischio di sviluppo di ipocalcemia; questo perché una dieta cationica induce una condizione di alcalosi che va ad alterare la conformazione del recettore per il PTH, rendendo i tessuti meno sensibili all'ormone e diminuendo di conseguenza il riassorbimento renale e osseo di calcio e l'assorbimento intestinale dipendente dall'attivazione della vitamina D (Goff, 2008).

Siccome la maggior parte dei foraggi presenta una quantità di potassio elevato è necessario aggiungere una quantità bilanciata di anioni per ottenere un DCAD in modo da acidificare il sangue e diminuire il rischio di sviluppo di ipocalcemia (Constable et al., 2017).

Una animale ipocalcémico presenta una sintomatologia che dipende essenzialmente dallo stadio di gravità in cui si trova. Nel primo stadio la bovina è ancora in piedi, può presentare uno stato di eccitazione e tetania con tremori della testa e degli arti. Quest'ultimi si possono presentare rigidi, con nel complesso un animale atassico e che cade facilmente. Questa fase può perdurare per diverse ore. Il secondo stadio è caratterizzato da un decubito sternale prolungato, con la bovina tipicamente depressa e incapace di restare in piedi. Il musello è asciutto, la pelle e le estremità fredde con una temperatura di 36-38°C; aumenta la frequenza cardiaca fino a 80 bpm e il polso si presenta debole. Il terzo è ultimo stadio rappresenta un aggravamento delle condizioni precedenti; decubito laterale con animale in stato quasi comatoso che non riesce a raggiungere il decubito sternale. La temperatura si abbassa ulteriormente e il sistema cardiovascolare è ancora più depresso, con tachicardia che può raggiungere fino a 120 bpm e un polso impalpabile (Constable et al., 2017).

La sindrome ipocalcémica a seconda della sua gravità, porta con sé delle importanti conseguenze economiche: prima di tutto la riduzione della produttività dell'animale, i costi associati ai trattamenti e i costi indiretti dovuti a problemi di salute che possono derivare da questa patologia (Ibrahim and Kirmani, 2021). Fra questi troviamo la distocia, la ritenzione di placenta, metrite, mastite, dislocazione dell'abomaso, chetosi (Constable et al., 2017).

La diagnosi si basa sulla visita clinica e viene confermato da una risposta positiva e rapida al trattamento; sarebbe opportuno inoltre raccogliere un campione di sangue pretrattamento per confermare o non la diagnosi in caso di mancata risposta al trattamento (McArt and Oetzel, 2023).

L'animale deve essere trattato il prima possibile, se infatti questo rimane per più di 4 ore in decubito sternale, è più facile che si presentino complicazioni. Il trattamento standard consiste di una somministrazione endovena (EV) di calcio borogluconato oppure un trattamento orale con soluzioni di sali di calcio (Constable et al., 2017).

Fra le diagnosi differenziali si ritrovano patologie metaboliche, malattie associate a tossiemia e shock, lesioni alla pelvi o agli arti pelvici, miopatia degenerativa e sindrome della vacca terra (Constable et al., 2017).

#### 1.4. Sindrome della vacca a terra

Per "sindrome della vacca a terra" o "*downer cow syndrome*" si intende una bovina periparto che si trova in decubito sternale quando la ragione di questo decubito non è conosciuta e la situazione si protrae da 24 ore (Cox, 1988; Correa et al., 1993). La bovina che mantiene il decubito sternale mentre continua ad alimentarsi e abbeverarsi viene definita come *alert downer cow*, o vacca a terra

vigile (Smith et al., 2019); la causa va ricercata nella maggior parte dei casi in lesioni muscolo-scheletriche e neurologiche come lesioni secondarie a distocia del nervo sciatico od otturatorio, in fratture dell'omero o della pelvi, lussazione d'anca o lesioni muscolari da traumi primari o secondari a decubito prolungato (Constable et al., 2017). Per contrapposizione una *non-alert downer*, o vacca a terra non vigile, si viene a definire come una bovina con segni di stato mentale alterato e segni vitali anormali (frequenza respiratoria, frequenza cardiaca e temperatura rettale) (Burton et al., 2009; Dahlberg, 2012); le cause in questo caso possono essere malattie sistemiche che influenzano lo stato mentale, come ipocalcemia periparto, setticemia, ipovolemia, peritonite diffusa e lipidosi epatica severa, e disordini neurologici del tronco encefalico o della corteccia cerebrale. In aggiunta, il termine *creeper cow* definisce una vacca vigile ma che è incapace di mantenere il peso sugli arti posteriori, quindi utilizza gli arti anteriori per muoversi per brevi distanze (Constable et al., 2017). La sindrome si presenta più comunemente nei primi 2 o 3 giorni dopo il parto in bovine ad alta produzione immediatamente conseguente alla sindrome ipocalcémica (Cox, 1988; Constable et al., 2017). L'incidenza della sindrome non è facilmente individuabile perché la *downer cow syndrome* è stata definita in maniera differente negli anni (Dahlberg, 2012); secondo la definizione di cui sopra l'incidenza è stata stimata di 21.4 casi per 1000 bovine annue (Cox et al., 1986).

I principali fattori di rischio per lo sviluppo della sindrome sono essenzialmente le complicazioni da collasso puerperale, a causa dell'elevata pressione su un'area anatomica ristretta che si viene a creare durante il decubito, tale per cui l'incidenza della *downer cow syndrome* in seguito a collasso arriva ad essere del 28.2%, con una fatalità del 20-67%. A questo seguono le lesioni legate al parto, con incidenza del 22%, in particolare la paresi o paralisi di uno o entrambi gli arti posteriori dovuta a una lesione del nervo otturatore o della radice lombare del nervo sciatico che può avvenire durante il parto, di solito per presenza di distocia, vitelli di grandi dimensioni o parti prolungati (Constable et al., 2017).

Oltre all'ipocalcemia, altre alterazioni elettrolitiche potrebbero risultare dei fattori di rischio:

- Ipofosfatemia: sulla quale non c'è accordo su quale sarebbe il meccanismo di causa-effetto (Constable et al., 2017) e taluni (Ménard and Thompson, 2007) sostengono che i livelli di fosforo (P) pretrattamento possono influenzare la risposta dell'animale, mentre uno studio più recente (Leduc et al., 2023) sostiene come il livello non influenzi la prognosi e come i livelli sierici di P debbano essere interpretati con cautela;

- Ipomagnesemia: è spesso associata con la sindrome, soprattutto quando si accompagna ad ipocalcemia, ma si manifesta con uno stato di tetania, che non fa parte del quadro della *downer cow syndrome* (Constable et al., 2017);
- Ipokalemia: quando severa si associa a depressione e debolezza muscolo-scheletrica che possono portare a decubito prolungato (Sattler and Fecteau, 2014).

Altri fattori sono: la pavimentazione, che può essere scivolosa e causare la caduta dell'animale; età e stadio di lattazione, con vacche più vecchie e in uno stadio più recente di lattazione che possiedono tassi di recupero maggiori; durata del decubito, che quando è minore migliora il tasso recupero; e BCS, che essendo un fattore di rischio per *milk fever* risulta esserlo anche per la *downer cow syndrome* (Constable et al., 2017).

La patogenesi della sindrome è essenzialmente la complicazione di un problema primario che ha causato debolezza muscolare o decubito persistente. Come tali, le condizioni primarie possono essere: disordini metabolici, come ipocalcemia e ipokalemia, malattie sistemiche acute, come mastite da coliformi e metrite tossica, disordini muscoloscheletrici come fratture e lussazioni articolari, e cause indeterminate. Un decubito prolungato causa un danno secondario dovuto alla pressione eccessiva sugli arti; questo danno può riguardare muscoli, nervi o altre componenti strutturali come ossa e articolazioni (Constable et al., 2017). Secondo studi sperimentali, 6 ore di decubito rappresentano il limite di tempo dopo il quale ci si aspetta un danno tissutale in seguito ad una pressione eccessiva (Cox and Onapito, 1986). Al danno tissutale localizzato segue un rilascio massivo di prodotti di degradazione muscolare-tissutale; si può quindi notare un aumento sierico di aspartato aminotransferasi (AST), di creatinichinasi (CK), che tende ad elevarsi marcatamente a 12 ore dall'inizio del decubito, aumento delle concentrazioni di potassio e fosforo e come ultimo la presenza di mioglobina nelle urine, che viene rilasciata dalle cellule muscolari danneggiate e aumenta così dalle 12 alle 36 dall'inizio del decubito (Constable et al., 2017).

Le diagnosi differenziali per le bovine *alert* sono: ipocalcemia, paralisi da parto, frattura del femore o della pelvi, lussazione d'anca, ipokalemia, botulismo e linfosarcoma spinale. Invece, le diagnosi differenziali per le bovine *non alert* sono: ipocalcemia, lipidosi epatica/coma epatico puerperale, mastite da coliformi, metrite tossica, ipomagnesemia, shock settico ed ipovolemico, peritonite generalizzata, acidosi ruminale acute, dislocazione abomasale destra, ipokalemia, botulismo, meningoencefalite e poliencefalomalacia (Constable et al., 2017).

La diagnosi di *downer cow syndrome* viene fatta sulla base dell'anamnesi concentrandosi su età e stadio di lattazione, durata del decubito, ambiente in cui l'animale vive e la tipologia di

pavimentazione. Di seguito deve essere svolta una visita clinica generale dell'animale. In particolare, nella bovina che ha appena partorito deve essere posta particolare attenzione alla mammella, all'utero e al tratto gastrointestinale, per escludere quelle che sono rispettivamente mastite, metrite e tossiemia, disidratazione e shock. È utile svolgere un esame delle urine per evidenziare la presenza di eventuale mioglobinuria. È inoltre fondamentale un esame dell'apparato muscolo-scheletrico in toto, da entrambi i lati dell'animale. La diagnosi verrà quindi ricavata dall'esclusione di tutte le altre cause di decubito persistente da almeno 24 ore, dopo aver somministrato almeno due trattamenti parenterali di calcio (Constable et al., 2017).

Il trattamento deve essere rivolto alle cause primarie di decubito quando queste sono state identificate, ma è fondamentale che venga anche fatta una cura di supporto in merito al danno secondario derivato dal decubito. L'aspetto più importante è quello ambientale: l'animale deve essere posto su una lettiera confortevole e deve essere spostato da un decubito laterale all'altro ogni 4-8 ore. Se l'animale è disidratato o anoressico deve essere fornita una fluidoterapia orale, sempre che venga mantenuto un buon riflesso di deglutizione e senza superare la soglia di 40 litri di fluidi per evitare il reflusso da eccessiva pressione intraruminale. È possibile fornire una terapia con farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) o corticosteroidi, per controllare il dolore e l'infiammazione scatenata dal decubito prolungato e il danno secondario. Se l'animale dimostrasse volontà ad alzarsi dovrebbe essere aiutato trazionando la coda o utilizzando dei dispositivi di sollevamento. Se il recupero non avviene nel giro di qualche giorno, la prognosi è incerta e la decisione se effettuare l'eutanasia dovrebbe essere presa (Constable et al., 2017).

## 1.5. La dislocazione dell'abomaso

La dislocazione dell'abomaso è una condizione in cui l'abomaso aumenta il proprio volume, essendo repleto di fluidi e/o gas, con conseguente migrazione a destra o sinistra e dorsalmente nella cavità addominale. La dislocazione abomasale destra (RDA) può essere accompagnata dalla torsione, mentre la dislocazione abomasale sinistra (LDA) è associata all'accumulo di gas (Coppock, 1974). La LDA risulta essere la più frequente tra le due, 90% di tutte le dislocazioni, con un'incidenza che può variare tra 1,4% e 5,8% (Shaver, 1997).

Il periodo di rischio maggiore per la dislocazione a sinistra sono le prime 6 settimane post-parto, con il 90% dei casi di LDA che avvengono in questo lasso di tempo (Constable et al., 2017).

I principali fattori di rischio per lo sviluppo di questa patologia sono i fattori dietetici e quelli legati all'animale. Tra i fattori dietetici fondamentale risulta la nutrizione e il management in preparto:

una dieta preparto a contenuto energetico maggiore di 1,65 Mcal di EN/kg (EN: energia netta) porta la bovina a diventare obesa, la presenza di chetosi o il parto in stagione estiva provocano tutti un declino del DMI prima del parto; quest'ultimo riduce il riempimento e il volume del rumine, rendendolo più incline ad una dislocazione. Inoltre, spesso durante le ultime settimane preparto, alle bovine viene fornita una dieta ricca di concentrati; questo aumenta il flusso ruminale di ingesta all'abomaso, con l'aumento degli acidi grassi volatili, che inibiscono la motilità dell'abomaso e di conseguenza il flusso di ingesta verso il duodeno; in questo modo si crea un accumulo di gas che provoca la distensione e la dislocazione dell'abomaso (Constable et al., 2017). Oltre al contenuto energetico anche la lunghezza della fibra nella dieta può essere considerato un fattore di rischio; quando la razione è completamente pellettata, e quindi la fibra ha una ridotta lunghezza, l'incidenza di LDA arriva al 17.4%, mentre questa si assesta al 1,6% quando la razione è composta da fieno alfa-alfa, insilato di sorgo e un mix di proteina cruda al 18% (Dawson et al., 1992). Una fibra troppo corta riduce il riempimento ruminale, la motilità, l'attività di masticazione e aumenta la concentrazione ruminale di acidi grassi volatili, che sono tutti fattori che incrementano il rischio di LDA. Oltre ai fattori connessi all'alimentazione, anche razza ed età dell'animale possono incidere, con l'LDA maggiormente presente in razze per la produzione di latte, come la Holstein Friesian e la German Holstein, insieme agli incroci Simmental-Red-Holstein, Brown Swiss, Ayrshires, Guernseys e Jerseys (Doll et al., 2009); inoltre, il rischio aumenta con l'età, con un rischio maggiore negli animali dai 4 ai 7 anni di età (Constable et al., 2017). Una maggiore predisposizione in relazione alla produzione di latte non è accertata, ma uno studio (Zwald et al., 2004) ha osservato una relazione positiva (*product-moment correlation*) di 0.09 tra l'abilità di trasmissione predetta per la produzione di latte e la dislocazione dell'abomaso. In definitiva, anche lo stato fisiologico dell'animale è importante, in quanto immediatamente dopo il parto, nella cavità addominale della bovina, si libera uno spazio occupato precedentemente dal feto, che può favorire la dislocazione dell'abomaso. Infine, anche condizioni patologiche preesistenti, come l'ipocalcemia, in cui la motilità abomasale risulta ridotta, possono portare ad un aumento del rischio (Constable et al., 2017).

Una bovina con dislocazione abomasale sinistra si può presentare all'anamnesi con inappetenza, anoressia, un decremento sostanziale nella produzione di latte, diversi gradi di chetosi. Alla visita clinica ci sarà un appiattimento nella parete addominale sinistra per una diminuzione del volume ruminale. La diagnosi di dislocazione può essere confermata tramite manovre di percussione ed auscultazione, che quando svolte insieme sull'area tra la 9 e la 12 costa nel terzo superiore della parete addominale, forniscono all'ascolto un suono acuto e timpanico, cosiddetto "ping". Una

bovina con dislocazione abomasale destra si presenta all'anamnesi anch'essa con inappetenza e diminuzione della produzione di latte; in aggiunta la produzione di feci è ridotta e la consistenza è anormale. L'auscultazione e la simultanea percussione si rileva diagnostica per la presenza del "ping" nel fianco destro dell'animale. Alla dislocazione destra si accompagna spesso l'instaurarsi di un volvolo abomasale, che in stadio iniziale porta a depressione e inappetenza dell'animale, seguito poi da uno stadio avanzato in cui l'addome si presenta visivamente disteso, con depressione, debolezza e disidratazione marcata dell'animale; alla succussione ci sarà un guazzamento metallico molto marcato nei quadrati superiori dell'addome destro (Constable et al., 2017).

Il trattamento per entrambe le tipologie di dislocazione è di tipo chirurgico, con tecnica aperta o chiusa per la dislocazione sinistra, e solamente aperta per quella di destra (Constable et al., 2017). Le diagnosi differenziali per la dislocazione sinistra sono: indigestione semplice, chetosi primaria, reticolo-peritonite traumatica, indigestione vagale e lipidosi epatica. Per la dislocazione destra sono: indigestioni vagali, ulcere abomasali con ulcerazione, volvolo cecocolico e reticolo-peritonite traumatica cronica o subacuta; in caso di volvolo abomasale si aggiungono le ostruzioni intestinali e la peritonite acuta diffusa (Constable et al., 2017).

## 1.6. Ritenzione di placenta

La placenta dei ruminanti è di tipo cotiledonare ed epiteliochoriale; si compone di allantocorion, allantoamnios e il cordone ombelicale. La sua espulsione avviene nella terza fase del parto (Reece, 2015). Quando questa non avviene dalle 8 alle 12 ore post-parto, la placenta viene considerata ritenuta (Smith et al., 2019).

L'incidenza di questo fenomeno può variare dal 4% all'11% (Drillich et al., 2006), ma può arrivare ad essere anche del 50% in bovine con anomalie al parto, aborti o infezioni con brucellosi. La presenza di placenta ritenuta aumenta l'incidenza per alcune complicazioni post-parto come metrite, piometra, chetosi, mastite, un ritardo del successivo concepimento e aborto (Smith et al., 2019).

La causa di ritenzione di placenta è essenzialmente un disturbo nel meccanismo fisiologico di distacco tra i cotiledoni fetali e le caruncole materne (Smith et al., 2019). Il processo si svolge in tre fasi: la maturazione dei placentomi durante la fase finale della gravidanza e all'avvicinarsi del parto; la retrazione e il collasso dei villi cotiledonari; la contrazione e involuzione uterina che favoriscono la distorsione dei placentomi facilitandone l'espulsione (Attupuram et al., 2016). In aggiunta a questo, in risposta all'aumento di relaxina ed estrogeni precedentemente al parto, le collagenasi



tendono ad aumentare, promuovendo la degradazione del collagene a livello dell'interfaccia cotiledoni-caruncole (Smith et al., 2019).

I più importanti fattori di rischio associati alla ritenzione di placenta sono il parto indotto tramite utilizzo di desametasone, che può avere un effetto inibitorio sull'attività della collagenasi; deficienze nutrizionali di vitamina E e selenio, che sembrano favorire l'attività chemiotattica e l'aumento numero di leucociti, a livello della giunzione materno-fetale (Bourne et al., 2007); immunosoppressione, tale per cui i meccanismi immunoprotettivi volti ad evitare l'espulsione dell'unità materno-placentare non vengono interrotti (Beagley et al., 2010). Altre cause più comuni sono parti gemellari, placentiti, ipocalcemia, aborti, feti nati morti, distocie, parto cesareo e lunghezza ridotta di gravidanza (Smith et al., 2019).

Una bovina con ritenzione placentare può presentare in anamnesi senza segni clinici particolari, oppure si può avere una leggera inappetenza e una diminuita produzione di latte. In alcuni casi possono aggiungersi segni di endotossiemia e l'animale si presenta depresso, con febbre e stasi ruminale (Smith et al., 2019).

Alla condizione clinica di ritenzione si possono accompagnare disordini metabolici e riproduttivi; in particolare l'endometrite, che può causare un aumento del periodo parto-concepimento o parto-prima inseminazione (Han and Kim, 2005; Smith et al., 2019).

Il trattamento in alcuni casi non risulta necessario; in altri casi si prosegue con: la rimozione manuale, solamente quando è sufficiente una piccola trazione, altrimenti è sconsigliato in quanto il trauma causato da un tentativo di rimozione manuale può inibire la fagocitosi neutrofili e aggravare in questo modo la condizione clinica dell'animale; trattamento con boli di calcio, qualora sia presente ritenzione causata da ipocalcemia; trattamento con prostaglandine (Reece, 2015), con riduzione del periodo di ritenzione e l'incidenza di metrite. Il trattamento con antibiotici può essere utile per trattare metriti in seguito a ritenzione di placenta; invece, la somministrazione a casi non complicati di ritenzione non risulta utile, e anzi può causare un ritardo nella necrosi e quindi nel distacco del tessuto caruncolare (Beagley et al., 2010; Smith et al., 2019).

## 1.7. Le metriti

L'utero di una vacca in post è normalmente contaminato con una varietà di batteri, ma non sempre si associa ad una malattia clinica. Lo sviluppo di questa dipende dalla risposta immunitaria dell'animale, ma anche dalle specie e dal numero di batteri (Sheldon et al., 2006).

La risposta immunitaria può variare perché durante il periodo di transizione si può presentare una condizione di DMI ridotto, che porta ad uno stato energetico negativo. Il NEB induce un aumento della concentrazione nel sangue di NEFA e di corpi chetonici (Drackley, 1999). In particolare, esiste una correlazione negativa tra la funzione neutrofilica e le concentrazioni di NEFA e BHB (Hoeben et al., 2000); i neutrofili rappresentano il tipo di leucociti maggiormente coinvolte nella clearance dell'infezione uterina (Gilbert et al., 2007); inoltre avremo anche alterazioni della funzione linfocitaria (Lacetera et al., 2004), della risposta anticorpale e della produzione di citochine (Lacetera et al., 2005). In questo modo, animali con concentrazioni di NEFA pre e post-parto maggiori di 0,3 e 0,6 mmol/L rispettivamente sono associate ad un rischio maggiore di metrite, oltre che di dislocazione dell'abomaso, chetosi clinica e placenta ritenuta (Ospina et al., 2010).

Durante il periodo di transizione si ha una rapida differenziazione del parenchima secretorio mammario, un'intensa crescita della ghiandola e una copiosa produzione e secrezione di latte; queste insieme portano ad un aumento della richiesta di energia e di ossigeno; si ha un aumento della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), che portano l'animale in condizione di stress ossidativo; le cellule, che possiedono diversi meccanismi per la difesa, possono saturare tali meccanismi e quindi essere sottoposte ad un danno, che ulteriormente porta ad un maggior rischio di sviluppo di malattie (Gitto et al., 2002).

Il più importante fattore di rischio per lo sviluppo di metrite risulta essere la ritenzione di placenta, per il fatto che la placenta ritenuta risulta essere un ottimo mezzo per la crescita batterica (Bruun et al., 2002); si aggiungono anche la distocia, feto nato morto, nascite gemellari, vitello maschio, bovine primipare e la stagione invernale (Hosseini-Zadeh and Ardalani, 2011).

I batteri maggiormente presenti sono *Truperella Pyogenes*, che insieme a *Fusobacterium Necrophorum* e *Prevotella* agiscono per causare infezione uterina. Anche Coliformi, *Pseudomonas Aeruginosa*, streptococchi emolitici e batteri anaerobi Gram positivi e negativi possono essere isolati. *T. Pyogenes* e *Clostridium spp.* possono agire insieme per causare una metrite gangrenosa severa (Smith et al., 2019).

Possono essere presenti tre tipi di metrite nel periodo di transizione (Scott et al., 2011): metrite puerperale, in cui l'animale presenta perdite vaginali acquose, purulente, marroncine e fetide, con temperatura al di sopra di 39,2° C; metrite clinica, con la presenza delle stesse perdite, ma assenza di febbre (Giuliodori et al., 2013); entrambi possono presentarsi entro i 21 giorni dal parto (Scott et al., 2011). Quando vi è assenza di materiale purulento ma è presente un'inflammazione confermata da citologia possiamo avere endometrite subclinica (Sheldon et al., 2006).

L'incidenza della mastite clinica dipende dall'allevamento e dall'anno, ma generalmente si attesta tra il 10% e 40%. La mastite puerperale si presenta generalmente 2-4 giorni dopo il parto; l'animale si presenta depresso, inappetente e la produzione di latte arriva ad essere un terzo di quella attesa. Può essere presente diarrea, la vulva è edematosa in caso di distocia e l'utero arriva a contenere fino a 5-10 L di fluido rosso/brunastro. La mastite clinica non evidenzia segni sistemici, ma si presenta comunque con perdite purulente dalla vulva (Scott et al., 2011).

La diagnosi viene raggiunta tramite anamnesi, segni clinici e eliminazione di altre patologie. L'ispezione vaginale promuove la fuoriuscita dei fluidi; la palpazione rettale permette di rilevare un aumento di volume delle corna uterine. Tramite ecografia transrettale è possibile visualizzare fluido anecoico nel lume uterino con presenza di punti iperecoici, rappresentativi di materiale purulento (Scott et al., 2011).

Il trattamento è diverso a seconda che si tratti di metrite puerperale o clinica: nel primo caso si esegue una terapia endovenosa immediata con ossitetraciclina, associata a FANS, seguito da iniezioni intramuscolo dello stesso principio attivo nei successivi 3-4 giorni; nel secondo caso è necessario aspettare la presenza di un corpo luteo a 21-28 giorni post-parto in modo tale da poter effettuare il trattamento con prostaglandine PGF2alfa, che lisano il corpo luteo, favorendo il funzionamento del sistema immunitario innato dell'animale. Inoltre, è possibile l'aggiunta di un'infusione intrauterina di antibiotica. La prevenzione può essere fatta migliorando le condizioni di igiene al parto, in particolare in caso di distocia, ed evitando un eccessivo BCS al parto che porta alla lipomobilizzazione di grasso (Scott et al., 2011).

Le diagnosi differenziali in caso di metrite puerperale sono mastite tossica, salmonellosi, rottura dell'utero, acidosi, peritonite, ritenzione del secondo vitello, ipocalcemia, lipidosi epatica e dislocazione dell'abomaso. In caso di metrite cliniche possiamo avere pielonefrite, che si associa però ad altri segni clinici, oppure vaginite da trauma durante il parto (Scott et al., 2011).

## 1.8. Lipidosi epatica

Durante il primo periodo di lattazione, la quantità di energia richiesta per il mantenimento e la produzione di latte, eccede l'energia che la bovina riceve attraverso l'alimentazione. Di conseguenza, la bovina utilizza il grasso corporeo come fonte energetica (Goff and Horst, 1997).

Gli acidi grassi a catena lunga (LCFA: long-chain fatty acid) che entrano nel fegato derivano dai NEFA presenti nel plasma, ottenuti dalla mobilizzazione del tessuto adiposo. L'uptake dei NEFA dipende dalla loro concentrazione e dal flusso sanguigno che arriva al fegato (Gruffat et al., 1996). Gli LCFA

all'interno degli epatociti possono andare in contro a diverse vie metaboliche: vengono ossidati completamente generando adenosina trifosfato (ATP: *Adenosine triphosphate*) oppure parzialmente generando acetato e corpi chetonici; vengono trasformati in fosfolipidi; vengono esterificati in trigliceridi e in minor misura in fosfolipidi ed esteri del colesterolo (Gruffat et al., 1996). Quando l'esterificazione degli acidi grassi supera la degradazione dei trigliceridi tramite idrolisi o l'export tramite lipoproteine a bassa densità (VLDL), incorre il fenomeno di lipidosi epatica, costituito dallo stoccaggio dei lipidi in eccesso nel fegato (Grummer, 1993; Bobe et al., 2004).

Questo fenomeno avviene principalmente nelle 4 settimane post-parto, con circa il 50% delle bovine che presentano un accumulo di trigliceridi nel fegato. Sulla base del contenuto di trigliceridi è possibile classificare la lipidosi epatica in 4 categorie: assente quando il contenuto è inferiore all'1%, lieve da 1-5%, moderato da 5-10%, severo oltre il 10%. Nel primo mese dopo il parto dal 5 al 10% di bovine da latte presentano una condizione severa e dal 30 al 40% presentano una condizione moderata, che pone il 50% delle bovine ad un rischio maggiore per lo sviluppo di malattie e problemi riproduttivi (Bobe et al., 2004).

Come fattori di rischio possiamo avere fattori legati all'animale: qualsiasi patologia nell'animale che implichi una diminuzione dell'appetito e del DMI, come chetosi, dislocazione abomasale, mastite, ritenzione di placenta, ipocalcemie e *downer cow syndrome*, può portare allo sviluppo di lipidosi; in gruppo di animali ad alta produzione, fino al 30% di bovine può presentare lipidosi severa, siccome le richieste di energie risultano più alte. Anche l'alimentazione può risultare un fattore di rischio, perché quando una bovina viene alimentata eccessivamente durante il periodo di asciutta, questa tenderà ad accumulare grasso nel tessuto adiposo. In un animale obeso, gli adipociti hanno una dimensione maggiore e secernono la leptina, una sostanza ad attività ormonale, che porta a diminuire il DMI dell'animale e la sensibilità all'insulina, favorendo l'insorgenza della lipidosi epatica (Bobe et al., 2004). Inoltre, il tasso di gluconeogenesi nel fegato risulta essere non ottimale (Rukkwamsuk et al., 1999), determinando un prolungamento della lipolisi, che ancora una volta provoca l'incremento della quantità dei trigliceridi (Constable et al., 2017).

Un fegato steatosico alla valutazione macroscopica si presenta aumentato di volume, con i bordi arrotondati e una colorazione giallastra (Morrow et al., 1979); all'istologia, l'accumulo di acidi grassi nei casi lievi si limita alla sezione centrolobulare del lobulo epatico, ma quando la condizione si aggrava l'accumulo può arrivare alla sezione media per arrivare fino alla sezione periportale quando la situazione è severa (Veenhuizen et al., 1991). Gli epatociti possono subire un danno mitocondriale, la compressione e la diminuzione del volume del reticolo endoplasmatico, dei

sinusoidi e altri organelli; in questo modo l'integrità e la funzionalità cellulare risulta compromessa, causando necrosi. A questo consegue un aumento degli enzimi, in particolare l'aspartato transaminasi (AST) e ornitina carbamiltransferasi (OCT), e dei costituenti della bile nel plasma (Bohe et al., 2004). Associato a ciò, si ha anche un aumento dei valori plasmatici/sierici di NEFA, di acetoacetato e di BHB. Ma il fattore più rilevante risulta essere il rapporto NEFA plasmatici: colesterolo; quando questo è alto è indicativo di lipidosi epatica (Constable et al., 2017).

Alla visita la clinica la bovina presenta delle contrazioni ruminali deboli o assenti, si può presentare in decubito prolungato, con inappetenza che porta l'animale a diventare sempre più debole. Nella bovina da latte, sussiste una relazione tra la lipidosi epatica e una diminuzione delle performance riproduttive, con una ripresa tardiva del ciclo estrale, dovuta alla riduzione della sintesi degli ormoni steroidei (Zhou et al., 1997), e una diminuzione del tasso di concepimento (Constable et al., 2017), per riduzione del numero di oociti che sopravvivono durante lo sviluppo in una condizione di lipidosi epatica (Wensing et al., 1997).

Per la diagnosi risulta utile l'utilizzo dell'ecografia, in quanto all'aumentare del grasso nel fegato, vi è un aumento dell'ecogenicità dell'organo e i vasi risultano più piccoli (Smith et al., 2019). Uno studio ha inoltre valutato la possibilità di stimare con accuratezza il contenuto di trigliceridi attraverso la valutazione della texture epatica all'ecografia, attraverso la B-mode (Banzato et al., 2016). Il gold standard rimane comunque la biopsia epatica, con i valori già sopracitati, che permette di categorizzare la lipidosi sulla base della gravità dell'infiltrazione epatica di grasso (Smith et al., 2019).

Nelle diagnosi differenziali per la lipidosi epatica si trovano quelle patologie che si riscontrano tipicamente dopo il parto: dislocazione abomasale sinistra, ritenzione di placenta, metrite e chetosi primaria (Constable et al., 2017).

La terapia consiste in una gestione dell'alimentazione, fornendo fieno di buona qualità, altamente appetibile, associato al libero accesso all'acqua. La terapia farmacologica consiste nel trattamento con glicole propilenico, glicerolo o altri composti, che permettono di ridurre il tasso di mobilizzazione dei grassi; con colina, che fa aumentare il tasso di velocità con gli acidi grassi lasciano il fegato sottoforma di fosfolipidi. La terapia fluida si consiste di un'infusione intravenosa continua di soluzioni elettrolitiche e soluzione al 5% di glucosio (Constable et al., 2017).

## 1.9. Chetosi

L'iperchetonemia è l'innalzamento nel sangue dei corpi chetonici al di sopra del range fisiologico (Smith et al., 2019). I corpi chetonici derivano da due fonti principali: il butirrato nel ruminale e la mobilizzazione di grassi. Il primo viene quasi completamente metabolizzato durante il suo assorbimento ruminale (Weigand et al., 1972). Gli acidi grassi non esterificati sono trasportati al fegato e ossidati per formare acetyl-CoA e NADH (*nicotamide adenine dinucleotide*). L'acetyl-CoA viene ossidato attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA cycle) o metabolizzato ad acetoacetyl-CoA. L'ossidazione dipende dalla disponibilità di ossalacetato, derivante dal propionato; se mancante, l'acetyl-CoA diventa acetoacetyl-CoA e successivamente acetoacetato e BHB; questi ultimi possono essere utilizzati come fonte di energia. L'aceto-acetato può essere spontaneamente convertito in acetone, che è volatile, e come tale può essere esalato con il respiro. A livello ruminale, la flora può convertire l'acetone in isopropanolo, che può essere riassorbito (Constable et al., 2017). Il cut-off per considerare un'animale iperchetonemico varia da 1,2 a 1,4 mmol/L di concentrazione nel sangue, a seconda della sensibilità e specificità desiderata dai diversi studi (Smith et al., 2019). Nel periodo post-parto, soprattutto in animali ad alta produzione, si presenta la condizione di NEB; se la bovina non riesce ad adattarsi a questa condizione, essa può sviluppare una condizione di chetosi (Herdt, 2000).

Esistono cinque tipologie di chetosi:

- la chetosi primaria o da produzione che si presenta in bovine ad alto potenziale lattifero, nutrite con razione di buona qualità, ma che si trovano in uno stato di NEB. La patologia si presenta qualora sia presente una variazione nella capacità digestiva o nell'efficienza metabolica. Si può suddividere in chetosi clinica o subclinica, rispettivamente sulla base della presenza o assenza dei segni clinici;
- la chetosi secondaria che si presenta qualora via la presenza di altre malattie che provocano una riduzione dell'assunzione di mangime: dislocazione abomasale, reticolite traumatica, metrite, mastite o altre malattie comuni nel post-parto;
- la chetosi alimentare che si presenta quando è presente un'eccessiva quantità di butirrato nell'insilato;
- La chetosi da fame che si presenta quando la bovina ha un basso BCS e le viene fornita una razione di bassa qualità, in particolare povera di propionato e proteine, determinando una limitata capacità di gluconeogenesi nell'animale;

- La chetosi da carenza alimentare specifica che si presenta quando nella dieta vi è una mancanza di cobalto, per cui il suo ruolo nel ciclo TCA viene a mancare, impedendo l'ossidazione dei grassi (Constable et al., 2017).

La prevalenza media della chetosi subclinica risulta essere del 24,1%, con un range dall'8,3% al 40,1% (Brunner et al., 2019), mentre quella della chetosi clinica può variare dal 2% al 15% (Baird, 1982).

Senza contare l'eziologia, il 90% dei casi di chetosi avviene nei primi 60 giorni dopo il parto, più frequentemente nel primo mese di lattazione (Constable et al., 2017).

I principali fattori di rischio riguardano la bovina e la sua gestione: all'aumentare dell'età e del numero di lattazione il rischio di sviluppo di chetosi aumenta (Constable et al., 2017), con la quarta lattazione che presenta una prevalenza del 22% per la chetosi clinica (Kauppinen, 1983); un elevato BCS preparto diminuisce il DMI, aggrava la condizione di NEB (Hayirli et al., 2002), tale per cui in bovina con BCS al parto maggiore di 3,5 è presente un rapporto di probabilità (*odds ratio*) di 2,4 per lo sviluppo della chetosi ed inoltre tenderà a perdere una maggiore quantità di peso, rispetto ad una bovina sana (Gillund et al., 2001); il parto in inverno aumenta il rischio di chetosi (Constable et al., 2017), con un *odds ratio* nei mesi da gennaio a dicembre di 5,6 (Gröhn et al., 1989); bovine alimentate con un *total mixed ration* (TMR) presentano una prevalenza più bassa rispetto a bovine a cui vengono forniti foraggi e concentrati in momenti diversi della giornata (Constable et al., 2017). Altri fattori possono essere: eccessiva lunghezza del periodo di asciutta, bovine ad alta produzione, con elevato volume di colostro alla prima mungitura, presenza di ipocalcemia, ritenzione di placenta, metrite e ipomagnesemia (Constable et al., 2017).

La forma clinica si può presentare in due varianti, *wasting* e *nervosa*, ma spesso la bovina può presentare una sintomatologia con diverse gravità di queste due forme. La forma *wasting* risulta essere la più comune, e si presenta con una moderata diminuzione dell'appetito, soprattutto verso i concentrati (Baird, 1982), associata ad una perdita di peso, che però, nella sua gravità, non può essere spiegata dalla sola diminuzione del DMI. A questo si associa una diminuzione della produzione di latte, fino al 25%. Le feci si presentano più compatte e i movimenti possono essere meno frequenti (Constable et al., 2017). È caratteristica, anche nella forma *nervosa* (Scott et al., 2011), la presenza di un respiro acetonemico (Andrews, 1998) e dolciastro (Constable et al., 2017). Nella forma *nervosa*, la sintomatologia appare improvvisamente e si presenta in maniera variegata: *circling*, incrocio delle gambe, *head pressing*, cecità apparente, movimenti senza scopo, leccamento insistente della cute o di oggetti inanimati, pica e masticazione a vuoto. Gli episodi nervosi possono durare da 1 a 2 ore e si presentano a intervalli di 8-12 ore (Constable et al., 2017). Un esame fisico

completo dovrebbe essere svolto, in quanto l'iperchetonemia può aumentare il rischio di sviluppo di altre malattie come metrite e dislocazione dell'abomaso (Smith et al., 2019).

La forma subclinica, detta anche iperchetonemia, si presenta tendenzialmente senza segni clinici, ma si possono evidenziare una depressione nella produzione di latte, con una produzione potenziale ridotta dall'1% al 9%, e una riduzione della fertilità (Constable et al., 2017).

La bovina si presenta con una condizione di ipoglicemia, con valori da 20 a 40 mg/dL, anche se i valori possono essere più alti, oltre i 50 mg/dL, in caso di chetosi secondaria ad altre malattie.

Per quanto riguarda la valutazione della chetonemia, si valuta il BHB, in quanto più stabile nel plasma, anche raffreddato o congelato, rispetto all'acetoacetato. Una bovina sana presenta un BHB plasmatico al di sotto di 1 mmol/L, una bovina con chetosi subclinica ha concentrazioni al di sopra di 1.0, 1.2 o 1.4 mmol/L, a seconda del cut-point definito e sulla base del tempo trascorso dal parto; poiché le concentrazioni di BHB tendono ad avere un picco 8 giorni post-parto, il cut-off sarà di 1.0 mmol/L nella prima settimana e 1.4 mmol/L nella seconda. Bovine con chetosi clinica hanno concentrazioni di BHB superiori a 2.5 mmol/L, arrivando anche a 10 mmol/L. Risulta fondamentale il momento di prelievo, in quanto il BHB plasmatico ha un picco a 4 ore dall'alimentazione e tende ad essere più alta alla mattina, variazioni che non risultano presenti se la bovina è alimentata ad libitum (Constable et al., 2017). È possibile anche valutare la concentrazione dei corpi chetonici nelle urine e nel latte, in particolare esistono i *cowside test* che si contraddistinguono per avere un costo più basso, richiedono meno lavoro e i risultati sono immediati (Đoković et al., 2019); il lato negativo è che la sensibilità e la specificità non sono elevate tanto quanto i test basati sul sangue. Infatti, i *cowside test* sul latte possiedono una bassa sensibilità, mentre quelli sulle urine una bassa specificità. Nel latte inoltre è possibile analizzare il rapporto grasso-su-proteine (*fat-to-protein ratio*), in quanto un valore più grande di 1.5 al primo giorno di lattazione è indicativo di una mancanza di energia e un maggiore rischio per lo sviluppo di chetosi. Attraverso un ematobiochimico è possibile osservare un aumento dell'attività degli enzimi epatici, un aumento della bilirubina totale e delle concentrazioni di NEFA; quest'ultime tendono a passare da valori di 0.3 mmol/L da 3 giorni prima del parto, a valori intorno allo 0.7 mmol/L dal parto fino a 9 giorni dopo, diminuendo gradualmente dopo questo momento (Constable et al., 2017).

La diagnosi si basa sull'anamnesi, in particolare è importante stabilire quando è avvenuto il parto e il programma di alimentazione, accompagnata da visita clinica e esami biochimici, che rilevano la presenza di ipoglicemia, chetonemia e chetonuria (Constable et al., 2017).



Le diagnosi differenziali sono diversi sulla base della forma presente: per la forma *wasting* ci sono la dislocazione dell'abomaso, reticolite traumatica, indigestione primaria, cistite e pielonefrite; per la forma nervosa ci sono la rabbia, l'ipomagnesemia e l'encefalopatia spongiforme bovina (Constable et al., 2017).

### 1.10. Terapia per la chetosi

Il trattamento della chetosi è un trattamento di tipo farmacologico in caso di chetosi clinica, mentre per la chetosi subclinica vanno investigati i problemi di gestione e di nutrizione che hanno portato a questa condizione.

In passato, il primo approccio per la gestione della chetosi clinica è stato l'utilizzo del destrosio; un bolo di 500 mL di soluzione contenente il 50% di destrosio è capace di incrementare di 8 volte il valore di glucosio ematico immediatamente in seguito a somministrazione (Gordon et al., 2013), riduce la secrezione di glucagone e la concentrazione plasmatica di NEFA (Constable et al., 2017), ma dopo 15 minuti aumenta di 12 volte, il valore di insulina circolante; inoltre può ridur. Pertanto l'utilizzo di destrosio può risultare utile in animale che presentano segni neurologici, ma deve essere seguito da ulteriori trattamenti per favorire un successo a lungo termine (Gordon et al., 2013).

I glucocorticoidi sono stati utilizzati nel trattamento della chetosi per l'effetto iperglicemizzante (Herdt and Emery, 1992); il desametasone o flumetasone mediante somministrazione IM permettono in 24 ore la ripartizione del glucosio nel corpo (Constable et al., 2017). L'utilizzo di glucocorticoidi, nello specifico il desametasone, associato al glicole propilenico in animali chetonemici, non ha incrementato il livello di BHB e ha portato invece ad un aumento della glicemia maggiore rispetto agli animali trattati con glicole propilenico e soluzione salina (Van Der Drift et al., 2015).

Per il suo effetto anabolizzante (Hayirli, 2006), anche l'insulina è stata considerata per il trattamento della chetosi; essa diminuisce la lipolisi, favorendo la lipogenesi e l'utilizzo dei corpi chetonici come fonte energetica (Gordon et al., 2013). Il suo utilizzo complessato ad altri composti, come glucocorticoidi e destrosio, è risultato essere efficace rispettivamente nell'aumentare il tasso di cura e la produzione di latte (Robertson, 1966), e nel diminuire la concentrazione di BHB plasmatico e aumentare quella di glucosio e insulina 6 giorni dopo il trattamento (Sakai et al., 1993). Ciononostante, l'evidenza della sua efficacia rimane comunque limitata; questo, associato al costo elevato delle preparazioni preclude l'utilizzo dell'insulina su larga scala (Gordon et al., 2013).

Uno dei trattamenti più efficaci risulta essere l'utilizzo di precursori del glucosio: glicole propilenico e il glicerolo (Gordon et al., 2013); il primo più efficace siccome è necessario la metà della dose rispetto al secondo per favorire l'aumento della glicemia (Piantoni and Allen, 2015). Il glicole propilenico provvede a fornire i precursori (lattato, piruvato e propionato) per la gluconeogenesi epatica e favorisce l'ossidazione dell'acetyl-CoA nel ciclo TCA, costituendo un effetto antichetogenico, che porta a diminuire la concentrazione ematica di BHB (Zhang et al., 2020). Il suo utilizzo nell'immediato post-parto può portare ad un aumento della produzione latte (McArt et al., 2011) e una diminuzione del 40% dell'incidenza di dislocazione abomasale (McArt et al., 2012). Associato a questi, il glicole propilenico può fornire un supporto alle performance riproduttive, in particolare il concepimento alla prima inseminazione, la funzione ovarica e la crescita follicolare (Zhang et al., 2020).

Per il controllo e la prevenzione è fondamentale lavorare sull'alimentazione e sulla sua composizione, come viene fornito il mangime, con TMR o razioni separate; risulta difficile dare delle raccomandazioni generali per il controllo della chetosi, in quanto quest'ultima può dipendere da numerosi fattori. Associato a queste misure si utilizzano come supplementi energetici il glicole propilenico, fornito per OS con dosi che variano dai 350 ai 1000 mL al giorno per 10 giorni dopo il parto, e l'acido propionico, assorbito dal rumine e utilizzato nel fegato per la gluconeogenesi (Constable et al., 2017).

Nei paesi dove ne è permesso il suo utilizzo per questo scopo, si utilizza il Monensin, un antibiotico ionoforo che altera la flora ruminale, diminuendo la popolazione di Gram positivi, protozoi e funghi e aumentando la popolazione di Gram-negativi. L'effetto è quello di una riduzione della produzione di acetato e butirato e l'aumento della produzione di propionato (Constable et al., 2017). In questo modo, il Monensin è in grado di ridurre la prevalenza, l'incidenza e la durata della chetosi clinica e subclinica (Duffield et al., 1998, 1999), con una riduzione del BHB sierico, dell'acetoacetato e delle concentrazioni di NEFA (Constable et al., 2017).

### 1.11. Prevenzione della chetosi

L'inositolo è un polialcole presente in 9 forme stereoisomeriche; tra questo il mio-inositolo e il D-chiro-inositolo possiedono capacità insulino-mimetica (Croze and Soulage, 2013). L'insulina ha un'azione favorente la liponeogenesi e inibente la lipolisi; quest'ultimo porta all'incremento dei NEFA e la loro utilizzazione come substrato energetico, con incremento dei corpi chetonici in seguito a  $\beta$ -ossidazione (De Koster and Opsomer, 2013).

Nel fegato, la produzione di glucosio avviene a partire da diversi substrati, glicerolo, lattato, propionato e amminoacido glucogenici: tra questi ci sono l'alanina, la glutammina, arginina e treonina (Engelking, 2015); diversi studi hanno dimostrato l'importanza degli amminoacidi glucogenici nella patogenesi della chetosi (Li et al., 2014; Marczuk et al., 2018; Sun et al., 2014), in quanto una loro mancanza può essere un fattore di rischio per lo sviluppo della patologia (Basoglu et al., 2020). Inoltre, nel fegato, in seguito a lipomobilizzazione, i NEFA vengono metabolizzati per la produzione di energia; quando l'esterificazione degli acidi grassi supera la degradazione dei trigliceridi tramite idrolisi o l'export tramite VLDL, incorre il fenomeno di lipidosi epatica (Grummer, 1993; Bobe et al., 2004). La bovina presenta una predisposizione alla lipidosi in quanto nei ruminanti, la concentrazione di VLDL risulta essere minore a quella di altre specie (Palmquist, 1976). Il colesterolo è presente all'interno delle VLDL; il colesterolo totale può dare una misura indiretta della presenza di VLDL nel sangue e l'abilità del fegato a produrle. In animali con lipidosi epatica la concentrazione di colesterolo risulta più bassa rispetto che in animali sani (Mostafavi et al., 2013). Per la secrezione delle VLDL è inoltre necessaria la presenza della fosfatidilcolina, e di conseguenza della colina che la costituisce (Zeisel, 2013). La colina viene assunta attraverso la dieta, ma viene degradata rapidamente nel rumine; quindi, il suo assorbimento risulta basso (Pinotti et al., 2002). Essa può essere sintetizzata attraverso la donazione di gruppi metilici da parte di S-adenosil metionina, che deriva a sua volta dalla metionina, un amminoacido glucogenico che è coinvolto nella sintesi proteica, nella produzione di antiossidanti e nella donazione di gruppi metilici (Coleman et al., 2019). Siccome la lipidosi epatica è spesso associata alla chetosi, l'integrazione di colina e metionina possono risultare utili nel ridurre l'incidenza della chetosi e aumentare lo stato di salute nelle bovine durante il primo periodo di lattazione (Ardalan et al., 2010).

La vitamina B12, o cianocobalamina, ha un ruolo nel ciclo TCA: l'enzima metilmalonil-CoA-mutasi è vitamina B12-dipendente e trasforma il metilmalonil-CoA in succinil-CoA. Una somministrazione esogena può aumentare il tasso di gluconeogenesi epatica (Kennedy et al., 1990) e le concentrazioni di glucosio, migliorando lo stato energetico dell'animale (Fiore et al., 2016).

L'acido  $\alpha$ -lipoico, un derivato dell'acido ottanoico, è un importante componente di diversi complessi enzimatici cellulari (Bustamante et al., 1998); viene anche definito come l'antiossidante degli antiossidanti, perché quando interagisce con quest'ultimi è in grado di rigenerarli (Goręca et al., 2011). Il suo utilizzo può portare ad una riduzione della steatosi epatica (Park et al., 2008).

Per i motivi sopracitati, l'utilizzo, durante il periodo di transizione, di composti a base di amminoacidi (alanina, arginina, treonina, glutammina e metionina), vitamine (cianocobalamina) e inositolo può

essere utile nella prevenzione della chetosi e lipidosi epatica nelle bovine da latte ad alta produzione.

### 1.12. Costo della chetosi

Insieme a laminite, dislocazione abomasale, metrite, mastite, ritenzione di placenta e ipocalcemia, la chetosi fa parte delle patologie più presenti nell'allevamento della vacca da latte (Liang et al., 2017); un animale chetotico possiede un aumento rischio di sviluppo per disordini correlati al metabolismo e una maggiore probabilità di abbattimento, insieme ad una diminuzione della produzione latte e delle performance riproduttive (Ospina et al., 2010). Quindi, la salute dell'animale influenza la sua produttività e porta, nel caso in cui questa venga meno, ad un aumento dei costi e variazioni del profitto dell'allevamento (Huime et al., 1997).

Cainzos et al. hanno raccolto i risultati di 10 studi, riportando un costo variabile per ogni caso di chetosi tra i 19\$ e gli 812\$. Questa variabilità è essenzialmente dovuta a quale tipologia di caso clinico l'allevatore si è trovato davanti: mastite clinica o subclinica, numero di lattazione, eventuale presenza di altre patologie e necessità di abbattimento dell'animale. In caso di mastite subclinica, Gohary et al. hanno stimato un costo totale di 203\$ per caso; questo costo è suddiviso tra: aumento dell'incidenza di patologie cliniche associate alla chetosi subclinica (*SCK: subclinical ketosis*), aumento del tempo per il concepimento, abbattimento e morte in lattazione precoce in relazione all'SCK e perdita di produzione latte. Questi numeri confermano quindi che la SCK può avere forte impatto su quella che è la produttività dell'intera mandria (Ospina et al., 2010).

Un programma di monitoraggio per la SCK può portare ad una diminuzione dei costi con un rapporto costo su beneficio che nello studio di (Geishauser et al., 2001) è arrivato ad essere di 1:3.2. Senza il monitoraggio, stimando un costo di 78\$ per ogni caso di SCK, con un'incidenza del 40% sul intera mandria, le perdite ammontano ad un totale di 2808\$; per contro, utilizzando ogni anno 200 test da 1\$ ciascuno e trattando gli animali risultati positivi nelle prime due settimane di lattazione, addizionando le perdite per gli animali risultati positivi successivamente, il totale ammonta a 872\$. Nonostante il rapporto risulti essere il risultato di uno scenario specifico, è indubbio che un programma di monitoraggio e prevenzione possa portare beneficio ai profitti di un allevamento (Geishauser et al., 2001).

## 2. OBIETTIVI DELLA TESI

Lo scopo principale di questo studio è stato quello di valutare il siero di bovine non sottoposte a nessun protocollo preventivo per le chetosi, oppure sottoposte ad un protocollo preventivo completo o un protocollo preventivo semplificato.

L'obiettivo che si è posto questo studio è stato di:

- Valutare l'effetto di due differenti protocolli preventivi, completo e semplificato, su 22 parametri ematici;
- Valutare se il protocollo semplificato ha avuto la stessa efficacia del protocollo completo;
- Verificare la presenza di differenze tra i gruppi (CTRL, CMP e SMP) per alcuni parametri produttivi e nei rilievi clinici delle principali patologie del periodo di transizione;

L'utilizzo di un protocollo preventivo semplificato potrebbe risultare utile nell'ambito del settore della bovina da latte, siccome la chetosi, clinica o subclinica, e le altre patologie del periodo di transizione richiedono una gestione adeguata per evitare conseguenze sull'animale, sulla sua salute e sulla sua produzione.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. Azienda e animali

L'azienda in cui si è svolto lo studio è un allevamento intensivo di bovine da latte, situato nella regione Friuli-Venezia Giulia. L'azienda agricola comprende 888 bovine ad elevata produzione latte, di cui 750 bovine in lattazione, che producono una media di 150 quintali/capo. Le bovine sono allevate a stabulazione libera. Il periodo di asciutta previsto in azienda è di 60 giorni, durante in quale viene adottato lo steaming up. I capi sono alimentati con unifeed. La tabella rappresenta la dieta alimentare predisposta per le bovine in lattazione, in asciutta e in close up. I capi selezionati per lo studio sono stati scelti sulla base di: storia anamnestica (in particolare per l'incidenza delle patologie nel post-parto), età, ordine di parto, BCS, tipologia di parto (eutocico o distocico; singolo o gemellare) e produzione di latte.

**Tabella 1:** Composizione chimica della dieta di bovine in lattazione, asciutta e closeup.

Composizione chimica	Lattazione (% SS)	Asciutta (%SS)	Close-up (% SS)
NFC	43,7	26,9	31,5
CHO	46,29	45,53	44,14
Amido	20,5	6,9	12,6
Fibra Solubile	9,2	12,8	9,3
Zucchero	3,5	2,9	2,5
NDF	12,7	22,5	19,1
Zucchero (A4)	5,6	3,6	3,1
Amido (B1)	25,6	8,1	15,1
Fibra Solubile (B2)	10,3	13,5	9,8
Fibra Fermentescibile (B3)	18,1	32,5	26,5
NDF da Foraggi (%NDF)	80,8	98,03	94,78
NDF da Foraggi (%FBW)	0,89	0,99	0,82
EE	4,7	2,1	2,8
LCFA	3,7	1,4	2
CP	16,1	12,67	14,65
RDP	10,47	9,05	10,16
LYS (%MP)	7,32	7,18	7,14
MET (%MP)	2,66	2,59	2,64
LYS:MET	2,75	2,77	2,7
TDN	67,5	56	59,7
ME (Mcal/kg)	2,56	2,02	2,16
NEI (Mcal/kg)	1,65		
NEm (Mcal/kg)		1,17	1,3
NEg (Mcal/kg)		0,61	0,73
Foraggi	52,6	90,2	77,4
SS (%)	53,4	54,2	50
DCAD1 (meq/kg)	338	224	-266
DACD2 (meq/kg)	327	188	-141

**Legenda:** NFC: carboidrati non fibrosi, *non-fibrous carbohydrates*; CHO: carboidrati; NDF: *neutral detergent fiber*; EE: etere estratto, *ether extract*; LCFA: acidi grassi a catena lunga, *long chain fatty acid*; CP: proteina grezza, *crude protein*; RDP: proteine degradabili nel rumine, *rumen degradable protein*; LYS (%MP): lisina, *lysine*; MET (%MP): metionina, *methionine*; TDN: nutrienti digeribili totali; *total digestible nutrient*; ME (Mcal/kg): energia metabolizzabile; *metabolizable energy*; NEI (Mcal/kg): assunzione energetico netto; *net energy intake*; NEm (Mcal/kg): energia netta per il mantenimento, *net energy for maintenance*; NEg (Mcal/kg): energia netta per l'accrescimento, *net energy for gain*; SS (%): sostanza secca; DCAD1 (meq/kg): differenza cationi anioni della dieta, *dietary cation anion difference*; DACD2 (meq/kg): differenza anioni cationi della dieta, *dietary anion cation difference*

### 3.2. Protocollo sperimentale

La raccolta dei dati e dei campioni, che sono stati analizzati in questo studio, si è svolta da Febbraio 2022 a Maggio 2023. Lo studio si è svolto in un'azienda agricola, includendo 500 bovine di razza Frisona. Per ogni animale sono stati raccolti dei dati preliminari e sulla base di questi sono state selezionati all'inizio dell'asciutta. Le bovine selezionate sono poi state assegnate casualmente a tre gruppi, ognuno costituito da 45 animali, di cui 15 primipare e 30 pluripare:

- Il primo gruppo, di controllo (CTRL), le cui bovine non hanno ricevuto nessun protocollo preventivo;
- Il secondo gruppo (CMP), in cui le bovine hanno ricevuto un protocollo preventivo completo: due somministrazioni di BOGRASS (un composto a base di acetil-metionina, 15000 mg, inositolo, 3000 mg, cianocobalamina, 100 mg, alanina, 1500 mg, arginina, 1500 mg, treonina, 1500 mg, e glutammina, 1500 mg) a 12 e 9 giorni preparto, con un'iniezione di 2 mL/10kg (per somministrazione) per via intramuscolo (IM) nella regione dorso-laterale del collo; 7 somministrazioni di ERBACOLINA PLUS (un composto a base di acetil-metionina, 480 mg, cianocobalamina, 50 mg, e acido  $\alpha$ -lipoico, 25 mg) a 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 giorni post-parto, con un'iniezione di 20 mL/capo (per somministrazione) per via IM nella regione dorso-laterale del collo;
- Il terzo gruppo (SMP), in cui le bovine hanno ricevuto un protocollo preventivo semplificato: due somministrazioni di BOGRASS (2 mL/kg per somministrazione) + ERBACOLINA PLUS (70 mL/capo per somministrazione) a 7 giorni preparto e 7 giorni post-parto, con un'iniezione per via IM nella regione dorso-laterale del collo.

Le iniezioni sono state fatte tramite l'utilizzo di una siringa monouso da 100 mL con ago da 14G.

Durante tutto il periodo di studio sono stati raccolti i seguenti dati:

- parametri produttivi e riproduttivi: giorni di lattazione (DIM, *days in milk*) ad inizio asciutta, giorni di asciutta, litri di colostro, indice BRIX e numero di inseminazioni per gravidanza;
- rilievi clinici: nascita gemelli al parto, nati morti, valore medio per animale di casi clinici in lattazione, incidenza di: ritenzione placentare (entro le 24 ore), mastite, chetosi (>1 ng/mL, dato ottenuto in sala mungitura) e laminite.

Gli animali hanno ricevuto una valutazione clinica accompagnata da prelievo di sangue a 21 giorni preparto (T0), 7 giorni preparto (T1), il giorno del parto (T2), 7 giorni post-parto (T3), 14 giorno post-parto (T4), 28 giorni post-parto (T5), e 55 giorni post-parto (T6).

Il campionamento ematico è stato effettuato nella tarda mattinata dalla vena coccigea, in seguito a pulizia della faccia ventrale della coda della bovina. Attraverso il sistema vacutainer (VACUETTE®) sono state prelevate 2 aliquote, per entrambe sono state utilizzate provette contenenti Clot Activator (9 mL CAT Serum Clot Activator Greiner BioOne S.r.l, Italia) per favorire la coagulazione e ottenere il siero.

In allevamento, entro qualche ora dal prelievo, i campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti con centrifuga (Heraeus Labofuge 400, Thermo Scientific, Milano, Italia).

Una volta centrifugato, il siero delle due aliquote è stato diviso equamente in 4 Eppendorf della capacità di 1,5 mL; queste sono state etichettate e poi conservate in allevamento ad una temperatura di 4°C e al riparo da fonti luminose.

Le Eppendorf sono state poi trasportate in laboratorio e in attesa delle analisi biochimiche sono state stoccate ad una temperatura di -18°C.

### 3.3. Analisi di laboratorio dei campioni ematici

In laboratorio sono state eseguite le seguenti analisi: valutazione di glucosio, NEFA e BHB e biochimico. Glucosio, NEFA e BHB sono stati analizzati attraverso uno spettrofotometro a UV, Cobas C 501 analyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Il biochimico è stato eseguito attraverso un analizzatore automatico (BT3500; Biotecnica Instruments S.p.A., Roma, Italia); all'analisi biochimica sono stati valutati i seguenti parametri: trigliceridi (TG), colesterolo totale (TC), fosfolipidi, alanina amino transferasi (ALT), aspartato aminotransferasi (AST),  $\gamma$ -glutamminil-transferasi (GGT), lattato deidrogenasi (LDH), bilirubina totale (BT), albumina, proteine totali (PT), urea, creatinina, creatinfosfochinasi (CPK), fosfatasi alcalina (ALP), calcio, magnesio, potassio, sodio e cloro.

### 3.4. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta con il software S.A.S. (versione 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). I parametri biochimici raccolti sono stati analizzati mediante procedura PROC MIXED avente per fattori fissi il trattamento (CTRL, CMP, e SMP), il tempo di campionamento (T0, T1, T2, T3, T4, T5, e T6), e l'ordine di parto (primipare e pluripare), e come effetto randomico e ripetuto l'animale. Tutti i dati sono stati corretti post-doc con metodo Bonferroni. Un valore  $p < 0.05$  è stato utilizzato come soglia di significatività, mentre un valore  $p$  compreso tra 0.05 e 0.10 è stato applicato per identificare una tendenza alla significatività.



## 4. RISULTATI

### 4.1. Analisi laboratoristiche

A seguire sono presenti le medie, accompagnate da SEM (standard error of the mean, errore standard della media), p-values e significatività statistica, dei parametri ematici analizzati in laboratorio.

**Tabella 2:** Media, SEM (standard error of the mean, errore standard della media) e p-values interazione Gruppo\*Tempo (G\*T) e interazione Gruppo\*Tempo\*Parity (ordine di parto) (G\*T\*P) di glicemia, acidi grassi non esterificati (NEFA),  $\beta$ -idrossibutirrato (BHB), insieme alla significatività statistica, ottenute a T0 (14 giorni preparto), T1 (7 giorni preparto), T2 (il giorno del parto), T3 (7 giorni post-parto), T4 (14 giorni post-parto), T5 (28 giorni post-parto) e T6 (55 giorni post-parto). Par: parametro, P: parity, ordine di parto, TOT: gruppo totale degli animali, PRIM: primipare del gruppo, PLUR: pluripare del gruppo, CTRL: gruppo di controllo, CMP: gruppo con protocollo preventivo completo, SMP: gruppo con protocollo preventivo semplificato.

Par.	P	G	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	SEM	p-values	
											G*T	G*T*P
GLICEMIA mg/dL	TOT	CTRL	58,84 <sup>b</sup>	58,78 <sup>b</sup>	68,17 <sup>x,a</sup>	41,27 <sup>x,c</sup>	45,18 <sup>c</sup>	45,30 <sup>c</sup>	50,14 <sup>bc</sup>	5,48	0,009	0,013
		CMP	59,01 <sup>b</sup>	57,39 <sup>bc</sup>	76,72 <sup>xy,a</sup>	52,34 <sup>y,b</sup>	47,20 <sup>c</sup>	47,59 <sup>bc</sup>	48,56 <sup>bc</sup>	5,44		
		SMP	60,43 <sup>b</sup>	59,67 <sup>b</sup>	78,34 <sup>y,a</sup>	51,55 <sup>y,bc</sup>	48,97 <sup>bc</sup>	46,12 <sup>c</sup>	48,65 <sup>bc</sup>	5,48		
	PRIM	CTRL	60,78 <sup>ab</sup>	63,03 <sup>ab</sup>	72,84 <sup>x,a</sup>	40,29 <sup>x,b</sup>	50,03 <sup>b</sup>	45,91 <sup>b</sup>	53,03 <sup>ab</sup>	6,43		
		CMP	59,32 <sup>b</sup>	58,05 <sup>b</sup>	83,71 <sup>y,a</sup>	56,31 <sup>y,b</sup>	50,78 <sup>b</sup>	52,89 <sup>b</sup>	49,29 <sup>b</sup>	6,36		
		SMP	66,14 <sup>ab</sup>	62,86 <sup>ab</sup>	72,99 <sup>x,a</sup>	57,80 <sup>y,ab</sup>	53,99 <sup>ab</sup>	48,21 <sup>b</sup>	51,59 <sup>b</sup>	6,43		
	PLUR	CTRL	56,91 <sup>b</sup>	54,53 <sup>bc</sup>	63,50 <sup>x,a</sup>	42,26 <sup>c</sup>	40,33 <sup>c</sup>	44,69 <sup>c</sup>	47,24 <sup>bc</sup>	4,52		
		CMP	58,70 <sup>b</sup>	56,72 <sup>b</sup>	69,73 <sup>x,a</sup>	48,37 <sup>bc</sup>	43,62 <sup>c</sup>	42,30 <sup>c</sup>	47,83 <sup>bc</sup>	4,52		
		SMP	54,73 <sup>b</sup>	56,49 <sup>b</sup>	83,69 <sup>y,a</sup>	45,29 <sup>bc</sup>	43,95 <sup>c</sup>	44,04 <sup>c</sup>	45,70 <sup>bc</sup>	4,52		
NEFA mEq/L	TOT	CTRL	0,12 <sup>e</sup>	0,15 <sup>e</sup>	0,35 <sup>x,cd</sup>	0,56 <sup>x,ab</sup>	0,63 <sup>x,a</sup>	0,46 <sup>x,bc</sup>	0,26 <sup>d</sup>	0,06	0,005	0,032
		CMP	0,13 <sup>d</sup>	0,16 <sup>d</sup>	0,45 <sup>y,ab</sup>	0,44 <sup>y,ab</sup>	0,49 <sup>y,a</sup>	0,35 <sup>y,abc</sup>	0,23 <sup>cd</sup>	0,06		
		SMP	0,12 <sup>c</sup>	0,14 <sup>c</sup>	0,42 <sup>xy,ab</sup>	0,43 <sup>y,a</sup>	0,51 <sup>y,a</sup>	0,39 <sup>xy,b</sup>	0,29 <sup>b</sup>	0,06		
	PRIM	CTRL	0,12 <sup>c</sup>	0,17 <sup>c</sup>	0,25 <sup>x,c</sup>	0,55 <sup>x,a</sup>	0,52 <sup>x,ab</sup>	0,44 <sup>x,b</sup>	0,23 <sup>bc</sup>	0,08		
		CMP	0,14 <sup>b</sup>	0,17 <sup>b</sup>	0,50 <sup>y,a</sup>	0,43 <sup>y,a</sup>	0,41 <sup>y,a</sup>	0,33 <sup>y,ab</sup>	0,21 <sup>b</sup>	0,08		
		SMP	0,13 <sup>b</sup>	0,16 <sup>b</sup>	0,41 <sup>y,a</sup>	0,44 <sup>y,a</sup>	0,41 <sup>y,a</sup>	0,42 <sup>x,a</sup>	0,29 <sup>ab</sup>	0,08		
	PLUR	CTRL	0,11 <sup>e</sup>	0,13 <sup>e</sup>	0,44 <sup>c</sup>	0,56 <sup>x,b</sup>	0,74 <sup>x,a</sup>	0,49 <sup>x,bc</sup>	0,28 <sup>d</sup>	0,06		
		CMP	0,13 <sup>c</sup>	0,14 <sup>c</sup>	0,40 <sup>b</sup>	0,44 <sup>y,b</sup>	0,57 <sup>y,a</sup>	0,37 <sup>y,b</sup>	0,25 <sup>c</sup>	0,05		
		SMP	0,11 <sup>d</sup>	0,13 <sup>d</sup>	0,44 <sup>b</sup>	0,42 <sup>y,b</sup>	0,61 <sup>y,a</sup>	0,36 <sup>y,bc</sup>	0,29 <sup>c</sup>	0,05		
BHB mmol/L	TOT	CTRL	0,60 <sup>a</sup>	0,62 <sup>a</sup>	0,63 <sup>a</sup>	0,79 <sup>bc</sup>	0,89 <sup>x,c</sup>	0,90 <sup>x,c</sup>	0,68 <sup>ab</sup>	0,07	0,019	0,027
		CMP	0,57 <sup>a</sup>	0,59 <sup>a</sup>	0,56 <sup>a</sup>	0,72 <sup>b</sup>	0,73 <sup>y,b</sup>	0,62 <sup>y,ab</sup>	0,59 <sup>ab</sup>	0,07		
		SMP	0,60 <sup>abc</sup>	0,59 <sup>bc</sup>	0,55 <sup>c</sup>	0,75 <sup>a</sup>	0,73 <sup>y,ab</sup>	0,68 <sup>y,abc</sup>	0,64 <sup>abc</sup>	0,07		
	PRIM	CTRL	0,57 <sup>a</sup>	0,61 <sup>ab</sup>	0,65 <sup>ab</sup>	0,85 <sup>c</sup>	0,72 <sup>bc</sup>	1,06 <sup>x,c</sup>	0,71 <sup>bc</sup>	0,09		
		CMP	0,55 <sup>a</sup>	0,58 <sup>a</sup>	0,58 <sup>a</sup>	0,80 <sup>b</sup>	0,71 <sup>ab</sup>	0,59 <sup>y,a</sup>	0,60 <sup>a</sup>	0,08		
		SMP	0,59 <sup>a</sup>	0,60 <sup>a</sup>	0,55 <sup>a</sup>	0,81 <sup>b</sup>	0,74 <sup>ab</sup>	0,72 <sup>y,ab</sup>	0,67 <sup>a</sup>	0,08		
	PLUR	CTRL	0,62 <sup>a</sup>	0,62 <sup>a</sup>	0,61 <sup>a</sup>	0,72 <sup>ab</sup>	1,05 <sup>x,b</sup>	0,74 <sup>ab</sup>	0,65 <sup>a</sup>	0,06		
		CMP	0,60 <sup>ab</sup>	0,61 <sup>ab</sup>	0,55 <sup>a</sup>	0,65 <sup>ab</sup>	0,76 <sup>y,b</sup>	0,65 <sup>ab</sup>	0,58 <sup>ab</sup>	0,06		
		SMP	0,61 <sup>a</sup>	0,58 <sup>a</sup>	0,56 <sup>a</sup>	0,68 <sup>a</sup>	0,72 <sup>y,a</sup>	0,64 <sup>a</sup>	0,62 <sup>a</sup>	0,06		

Per quanto riguarda i valori di glucosio (Tabella 2), nel passaggio da T1 a T2 e da T2 a T3 tutti i gruppi di trattamento presentano un aumento statisticamente significativo seguito da una diminuzione dei valori di glucosio. Al tempo T2 e T3 vi sono delle differenze significative: a T2 il gruppo SMP presenta un valore maggiore rispetto al gruppo CTRL; a T3 i gruppi CMP e SMP presentano valori maggiori

rispetto al gruppo CTRL. Nel passaggio da T3 a T4, il gruppo CMP presenta una diminuzione statisticamente significativa del valore di glucosio.

Per quanto riguarda le differenze in base all'ordine di parto, sia primipare che pluripare presentano una diminuzione statisticamente significativa nel passaggio da T2 a T3 nel gruppo CTRL e un aumento nel passaggio da T1 a T2 e diminuzione da T2 a T3 nel gruppo CMP. In aggiunta, nelle pluripare l'aumento significativo seguito da diminuzione nel passaggio da T1 a T2 e da T2 a T3 è presente anche nel gruppo SMP. Ai tempi T2 e T3 abbiamo delle differenze statisticamente significative: a T2 le primipare del gruppo CMP presentano il valore maggiore rispetto gli altri gruppi, mentre le pluripare del gruppo SMP presentano il valore maggiore; a T3 le primipare dei gruppi CMP e SMP presentano i valori maggiori rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto riguarda i valori di NEFA (Tabella 2), nel passaggio da T1 a T2 si ha un aumento statisticamente significativo in tutti i gruppi; questo aumento è presente nel gruppo CTRL anche nel passaggio da T2 a T3, ma non negli altri gruppi. I gruppi CTRL e SMP nel passaggio da T4 a T5 presentano una diminuzione statisticamente significativa, mentre, solo nel gruppo CTRL, è presente una ulteriore diminuzione nel passaggio da T5 a T6. Al tempo T2, T3, T4 e T5 sono presenti delle differenze statisticamente significative: a T2 il gruppo CMP presenta un valore maggiore rispetto al gruppo CTRL, a T3 e T4 i gruppi CMP e SMP presentano un valore minore rispetto al gruppo CTRL; a T5 il gruppo CMP presenta un valore minore rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto riguarda le differenze in base all'ordine di parto, nel passaggio da T1 a T2 sia primipare che pluripare presentano un aumento significativo in tutti i gruppi tranne che nel gruppo CTRL delle primipare; nel passaggio da T2 a T3 solo le primipare e pluripare del gruppo CTRL presentano un aumento significativo. Nelle pluripare di tutti i gruppi nel passaggio da T3 a T4 si ha un aumento seguito nel passaggio da T4 a T5 da una diminuzione. Questa diminuzione è presente anche da T5 a T6, ma solo per i gruppi CTRL e CMP. A T2, T3, T4 e T5 sono presenti delle differenze statisticamente significative: a T2 le primipare dei gruppi CMP e SMP presentano i valori maggiori, mentre a T3 i valori minori; a T5 le primipare del gruppo CMP presentano il valore minore rispetto ai restanti gruppi; a T3, T4 e T5 le pluripare dei gruppi CMP e SMP presentano i valori minori.

Per quanto riguarda i valori di BHB (Tabella 2), nel passaggio da T2 a T3, tutti i gruppi di trattamento presentano un aumento statisticamente significativo dei valori di BHB. Nel passaggio da T5 a T6, il gruppo CTRL presenta una diminuzione significativa del valore di BHB. Al tempo T4 e T5 sono presenti delle differenze statisticamente significative: i gruppi CMP e SMP presentano valori minori rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto, le primipare di tutti i gruppi presentano nel passaggio da T2 a T3 un aumento statisticamente significativo. A T4 e T5 sono presenti delle differenze statisticamente significative: a T4 le pluripare dei gruppi CMP e SMP presentano valori minore rispetto al gruppo CTRL; a T5 sono invece le primipare degli stessi gruppi a presentare i valori minori.

**Tabella 3:** Media, SEM (standard error of the mean, errore standard della media) e p-values interazione Gruppo\* Tempo (G\*T) e interazione Gruppo\*Tempo\*Parity (ordine di parto) (G\*T\*P) di trigliceridi (TG), colesterolo totale (CT) e fosfolipidi (FOSF), insieme alla significatività statistica, ottenute a T0 (14 giorni preparto), T1 (7 giorni preparto), T2 (il giorno del parto), T3 (7 giorni post-parto), T4 (14 giorni post-parto), T5 (28 giorni post-parto) e T6 (55 giorni post-parto). Par: parametro, P: parity, ordine di parto, TOT: gruppo totale degli animali, PRIM: primipare del gruppo, PLUR: pluripare del gruppo, CTRL: gruppo di controllo, CMP: gruppo con protocollo preventivo completo, SMP: gruppo con protocollo preventivo semplificato.

Par	P	G	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	SEM	p-values	
											G*T	G*T*P
TG mg/dL	TOT	CTRL	21,63 <sup>b</sup>	26,49 <sup>a</sup>	8,73 <sup>c</sup>	9,40 <sup>c</sup>	10,05 <sup>c</sup>	10,27 <sup>c</sup>	10,60 <sup>c</sup>	1,66	0,281	0,403
		CMP	24,18 <sup>a</sup>	24,78 <sup>a</sup>	8,98 <sup>b</sup>	10,04 <sup>b</sup>	12,07 <sup>b</sup>	10,87 <sup>b</sup>	10,09 <sup>b</sup>	1,64		
		SMP	22,44 <sup>b</sup>	26,94 <sup>a</sup>	9,21 <sup>c</sup>	11,14 <sup>c</sup>	10,59 <sup>c</sup>	10,00 <sup>c</sup>	8,97 <sup>c</sup>	1,66		
	PRIM	CTRL	23,09 <sup>b</sup>	28,13 <sup>a</sup>	7,99 <sup>c</sup>	8,91 <sup>c</sup>	10,27 <sup>c</sup>	10,59 <sup>c</sup>	10,89 <sup>c</sup>	1,96		
		CMP	25,68 <sup>a</sup>	27,35 <sup>a</sup>	9,10 <sup>b</sup>	10,43 <sup>b</sup>	12,21 <sup>b</sup>	11,24 <sup>b</sup>	9,78 <sup>b</sup>	1,93		
		SMP	25,94 <sup>a</sup>	28,71 <sup>a</sup>	9,76 <sup>b</sup>	12,47 <sup>b</sup>	9,73 <sup>b</sup>	10,53 <sup>b</sup>	8,62 <sup>b</sup>	1,95		
	PLUR	CTRL	20,17 <sup>b</sup>	24,84 <sup>a</sup>	9,47 <sup>c</sup>	9,88 <sup>c</sup>	9,84 <sup>c</sup>	9,94 <sup>c</sup>	10,30 <sup>c</sup>	1,36		
		CMP	22,69 <sup>a</sup>	22,20 <sup>a</sup>	8,86 <sup>b</sup>	9,65 <sup>b</sup>	11,93 <sup>b</sup>	10,50 <sup>b</sup>	10,40 <sup>b</sup>	1,36		
		SMP	18,94 <sup>b</sup>	25,17 <sup>a</sup>	8,66 <sup>c</sup>	9,81 <sup>c</sup>	11,45 <sup>c</sup>	9,47 <sup>c</sup>	9,33 <sup>c</sup>	1,36		
CT mg/dL	TOT	CTRL	112,79 <sup>a</sup>	136,89 <sup>b</sup>	102,36 <sup>a</sup>	105,83 <sup>a</sup>	128,98 <sup>b</sup>	161,94 <sup>c</sup>	205,14 <sup>d</sup>	9,71	0,200	0,522
		CMP	114,22 <sup>a</sup>	129,37 <sup>b</sup>	109,78 <sup>a</sup>	110,75 <sup>a</sup>	128,67 <sup>b</sup>	155,92 <sup>c</sup>	194,67 <sup>d</sup>	9,66		
		SMP	109,41 <sup>a</sup>	123,69 <sup>b</sup>	101,50 <sup>a</sup>	103,21 <sup>a</sup>	123,12 <sup>b</sup>	160,39 <sup>c</sup>	198,84 <sup>d</sup>	9,70		
	PRIM	CTRL	112,81 <sup>a</sup>	141,59 <sup>b</sup>	112,29 <sup>a</sup>	110,72 <sup>a</sup>	124,62 <sup>a</sup>	161,27 <sup>b</sup>	213,42 <sup>c</sup>	11,41		
		CMP	115,93 <sup>a</sup>	129,42 <sup>ab</sup>	118,33 <sup>a</sup>	112,57 <sup>a</sup>	125,22 <sup>a</sup>	147,58 <sup>b</sup>	197,54 <sup>c</sup>	11,34		
		SMP	120,09 <sup>a</sup>	131,36 <sup>ab</sup>	112,63 <sup>a</sup>	108,69 <sup>a</sup>	124,94 <sup>a</sup>	158,92 <sup>b</sup>	203,05 <sup>c</sup>	11,41		
	PLUR	CTRL	112,77 <sup>a</sup>	132,19 <sup>b</sup>	92,43 <sup>a</sup>	100,94 <sup>a</sup>	133,34 <sup>b</sup>	162,61 <sup>c</sup>	196,85 <sup>c</sup>	8,01		
		CMP	112,51 <sup>a</sup>	129,31 <sup>b</sup>	101,24 <sup>a</sup>	108,93 <sup>a</sup>	132,12 <sup>b</sup>	164,27 <sup>c</sup>	191,81 <sup>c</sup>	8,02		
		SMP	98,72 <sup>a</sup>	116,02 <sup>b</sup>	90,36 <sup>a</sup>	97,72 <sup>a</sup>	121,29 <sup>b</sup>	161,87 <sup>c</sup>	194,62 <sup>c</sup>	7,99		
FOSF mg/dL	TOT	CTRL	6,51 <sup>a</sup>	7,00 <sup>a</sup>	4,65 <sup>xy,b</sup>	3,62 <sup>c</sup>	3,59 <sup>xy,c</sup>	4,41 <sup>b</sup>	4,98 <sup>b</sup>	0,40	0,001	0,047
		CMP	7,10 <sup>a</sup>	7,17 <sup>a</sup>	5,34 <sup>x,b</sup>	3,64 <sup>d</sup>	4,33 <sup>x,cd</sup>	4,20 <sup>cd</sup>	4,44 <sup>c</sup>	0,39		
		SMP	6,29 <sup>a</sup>	6,73 <sup>a</sup>	4,50 <sup>y,b</sup>	3,37 <sup>c</sup>	3,44 <sup>y,c</sup>	4,15 <sup>bc</sup>	4,17 <sup>bc</sup>	0,40		
	PRIM	CTRL	6,71 <sup>a</sup>	7,08 <sup>a</sup>	5,55 <sup>b</sup>	4,58 <sup>bc</sup>	4,40 <sup>c</sup>	4,82 <sup>bc</sup>	5,49 <sup>x,b</sup>	0,47		
		CMP	6,73 <sup>a</sup>	6,72 <sup>a</sup>	5,57 <sup>b</sup>	4,04 <sup>c</sup>	4,85 <sup>bc</sup>	4,25 <sup>c</sup>	4,55 <sup>xy,bc</sup>	0,46		
		SMP	6,57 <sup>a</sup>	6,71 <sup>a</sup>	4,70 <sup>b</sup>	3,92 <sup>c</sup>	4,01 <sup>bc</sup>	4,16 <sup>bc</sup>	4,16 <sup>y,bc</sup>	0,47		
	PLUR	CTRL	6,32 <sup>x,a</sup>	6,92 <sup>x,a</sup>	3,76 <sup>x,b</sup>	2,67 <sup>c</sup>	2,77 <sup>x,c</sup>	4,00 <sup>b</sup>	4,47 <sup>b</sup>	0,33		
		CMP	7,47 <sup>y,a</sup>	7,63 <sup>y,a</sup>	5,11 <sup>y,b</sup>	3,25 <sup>d</sup>	3,80 <sup>y,d</sup>	4,16 <sup>c</sup>	4,33 <sup>c</sup>	0,33		
		SMP	6,02 <sup>x,b</sup>	6,75 <sup>x,a</sup>	4,30 <sup>x,c</sup>	2,82 <sup>d</sup>	2,87 <sup>x,d</sup>	4,15 <sup>c</sup>	4,18 <sup>c</sup>	0,33		

Per quanto riguarda i valori di TG (Tabella 3), nel passaggio da T0 a T1 i gruppi CTRL e SMP presentano un aumento dei valori. Nel passaggio da T1 a T2 è presente in tutti i gruppi una diminuzione statisticamente significativa dei valori di trigliceridi.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto: nel primipare del gruppo CTRL e pluripare dei gruppi CTRL e SMP nel passaggio da T0 a T1 presentano un aumento statisticamente significativo;

nel passaggio da T1 a T2 le primipare e pluripare di tutti i gruppi presentano una diminuzione significativa.

Per quanto riguarda i valori di CT (Tabella 3), nel passaggio da T0 a T1 in tutti i gruppi è presente un aumento statisticamente significativo, seguito da una diminuzione nel passaggio da T1 a T2. Nel passaggio da T3 a T4, da T4 a T5 e da T5 a T6 è presente un aumento statisticamente dei valori di CT in tutti i gruppi.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto, le pluripare di tutti i gruppi presentano un diminuzione nel passaggio da T0 a T1, che continua anche da T1 a T2; nel passaggio da T3 a T4 le primipare di tutti i gruppi presentano un aumento dei valori, che continua anche nel passaggio da T4 a T5. Le primipare del gruppo CTRL presentano una diminuzione significativa da T0 a T1; le primipare di tutti i gruppi presentano da T4 a T5 un aumento significativo, che continua anche da T5 a T6.

Per quanto riguarda i valori di fosfolipidi (Tabella 3), nel passaggio da T1 a T2 è presente una diminuzione statisticamente significative in tutti gruppi, che continua anche nel passaggio da T2 a T3. Il gruppo CTRL presenta nel passaggio da T4 a T5 un aumento statisticamente significativo del valore di fosfolipidi. Al tempo T2 e T4 sono presenti delle differenze statisticamente significative: sia a T2 che T4 il gruppo SMP presenta valore minore rispetto al gruppo CMP.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto, le primipare e pluripare di tutti i gruppi presentano una diminuzione statisticamente significativa da T1 a T2, che continua nel passaggio da T2 a T3 per le primipare dei gruppi CMP e SMP e le pluripare di tutti i gruppi. Le pluripare del gruppo CTRL presentano un aumento nel passaggio da T4 a T5. A T0, T1, T2, T4 e T6 sono presenti delle differenze statisticamente significative: a T0, T1, T2 e T4 le pluripare del gruppo CMP presentano un valore maggiore rispetto i restanti gruppi; A T6 le primipare del gruppo SMP presentano un valore maggiore rispetto al gruppo CTRL.

**Tabella 4:** Media, SEM (standard error of the mean, errore standard della media) e p-values interazione Gruppo Tempo (G\*T) e interazione Gruppo\*Tempo\*Parity (ordine di parto) (G\*T\*P) di alanina aminotransferasi (ALT), aspartato aminotransferasi (AST), gamma glutamiltransferasi (GGT), insieme alla significatività statistica, ottenute a T0 (14 giorni preparto), T1 (7 giorni preparto), T2 (il giorno del parto), T3 (7 giorni post-parto), T4 (14 giorni post-parto), T5 (28 giorni post-parto) e T6 (55 giorni post-parto). Par: parametro, P: parity, ordine di parto, TOT: gruppo totale degli animali, PRIM: primipare del gruppo, PLUR: pluripare del gruppo, CTRL: gruppo di controllo, CMP: gruppo con protocollo preventivo completo, SMP: gruppo con protocollo preventivo semplificato.

Par.	P	G	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	SEM	p-values	
											G*T	G*T*P
ALT U/L	TOT	CTRL	18,18 <sup>a</sup>	18,81 <sup>a</sup>	16,50 <sup>a</sup>	18,77 <sup>a</sup>	18,68 <sup>a</sup>	19,72 <sup>a</sup>	24,61 <sup>b</sup>	2,39	0,168	0,528
		CMP	14,51 <sup>a</sup>	18,18 <sup>b</sup>	17,34 <sup>ab</sup>	18,45 <sup>b</sup>	18,06 <sup>ab</sup>	20,34 <sup>b</sup>	24,08 <sup>c</sup>	2,37		
		SMP	18,09 <sup>ab</sup>	20,52 <sup>ab</sup>	18,56 <sup>ab</sup>	18,58 <sup>ab</sup>	18,08 <sup>a</sup>	18,85 <sup>a</sup>	22,89 <sup>b</sup>	2,39		
	PRIM	CTRL	13,33 <sup>a</sup>	14,93 <sup>a</sup>	13,86 <sup>a</sup>	19,18 <sup>ab</sup>	19,05 <sup>a</sup>	21,23 <sup>a</sup>	27,11 <sup>b</sup>	2,81		
		CMP	10,45 <sup>a</sup>	13,60 <sup>ac</sup>	14,42 <sup>ac</sup>	16,89 <sup>abc</sup>	17,47 <sup>abc</sup>	20,75 <sup>bc</sup>	24,30 <sup>b</sup>	2,77		
		SMP	14,42	16,11	16,60	19,01	18,08	18,19	22,59	2,81		
	PLUR	CTRL	23,02	22,69	19,14	18,36	18,31	18,20	22,10	1,97		
		CMP	18,57 <sup>a</sup>	22,76 <sup>b</sup>	20,25 <sup>ab</sup>	20,02 <sup>ab</sup>	18,65 <sup>ab</sup>	19,94 <sup>ab</sup>	23,87 <sup>ab</sup>	1,96		
		SMP	21,77 <sup>ab</sup>	24,94 <sup>a</sup>	20,52 <sup>b</sup>	18,14 <sup>b</sup>	18,09 <sup>b</sup>	19,51 <sup>ab</sup>	23,19 <sup>ab</sup>	1,96		
AST U/L	TOT	CTRL	62,31 <sup>ab</sup>	59,70 <sup>b</sup>	70,21 <sup>x,a</sup>	86,99 <sup>x,c</sup>	79,32 <sup>x,c</sup>	63,80 <sup>x,ab</sup>	58,47 <sup>b</sup>	5,54	0,000	0,010
		CMP	52,20 <sup>a</sup>	52,30 <sup>a</sup>	61,27 <sup>xy,ab</sup>	76,83 <sup>y,b</sup>	66,54 <sup>y,b</sup>	57,29 <sup>y,ab</sup>	58,00 <sup>ab</sup>	5,50		
		SMP	50,39 <sup>a</sup>	54,28 <sup>ab</sup>	60,43 <sup>y,b</sup>	78,64 <sup>y,c</sup>	66,26 <sup>y,b</sup>	57,31 <sup>y,ab</sup>	59,56 <sup>ab</sup>	5,51		
	PRIM	CTRL	66,27 <sup>a</sup>	62,99 <sup>a</sup>	77,63 <sup>x,b</sup>	87,84 <sup>x,c</sup>	79,06 <sup>x,b</sup>	65,53 <sup>a</sup>	58,67 <sup>a</sup>	6,52		
		CMP	47,36 <sup>a</sup>	51,69 <sup>a</sup>	64,41 <sup>y,b</sup>	76,04 <sup>y,c</sup>	66,24 <sup>y,b</sup>	57,73 <sup>ab</sup>	57,10 <sup>ab</sup>	6,44		
		SMP	50,34 <sup>a</sup>	55,72 <sup>ab</sup>	64,36 <sup>y,b</sup>	83,93 <sup>xy,c</sup>	66,63 <sup>y,b</sup>	59,06 <sup>ab</sup>	62,11 <sup>ab</sup>	6,48		
	PLUR	CTRL	58,34 <sup>a</sup>	56,42 <sup>a</sup>	62,79 <sup>ab</sup>	86,13 <sup>x,c</sup>	79,58 <sup>x,c</sup>	62,07 <sup>ab</sup>	58,27 <sup>a</sup>	4,56		
		CMP	57,04 <sup>ab</sup>	52,91 <sup>a</sup>	58,13 <sup>ab</sup>	77,62 <sup>y,c</sup>	66,83 <sup>y,b</sup>	56,86 <sup>ab</sup>	58,91 <sup>ab</sup>	4,55		
		SMP	50,44 <sup>a</sup>	52,84 <sup>a</sup>	56,49 <sup>ab</sup>	73,34 <sup>y,b</sup>	65,88 <sup>y,b</sup>	55,56 <sup>ab</sup>	57,01 <sup>ab</sup>	4,54		
GGT U/L	TOT	CTRL	19,20 <sup>a</sup>	19,64 <sup>a</sup>	20,37 <sup>a</sup>	20,90 <sup>a</sup>	22,13 <sup>a</sup>	30,31 <sup>x,b</sup>	28,30 <sup>b</sup>	2,48	0,000	0,000
		CMP	18,00 <sup>a</sup>	17,72 <sup>a</sup>	20,22 <sup>a</sup>	20,56 <sup>a</sup>	21,35 <sup>a</sup>	22,34 <sup>y,a</sup>	26,30 <sup>b</sup>	2,43		
		SMP	19,63 <sup>a</sup>	19,88 <sup>a</sup>	22,32 <sup>a</sup>	20,41 <sup>a</sup>	23,01 <sup>a</sup>	26,82 <sup>xy,b</sup>	31,14 <sup>c</sup>	2,45		
	PRIM	CTRL	17,50 <sup>a</sup>	18,97 <sup>a</sup>	21,58 <sup>a</sup>	23,01 <sup>a</sup>	24,16 <sup>ab</sup>	37,39 <sup>x,c</sup>	30,14 <sup>b</sup>	2,93		
		CMP	14,62 <sup>a</sup>	15,26 <sup>a</sup>	20,19 <sup>ab</sup>	20,81 <sup>ab</sup>	22,03 <sup>ab</sup>	22,21 <sup>y,ab</sup>	28,14 <sup>b</sup>	2,86		
		SMP	18,87 <sup>a</sup>	17,85 <sup>a</sup>	23,30 <sup>a</sup>	21,22 <sup>a</sup>	24,39 <sup>a</sup>	26,72 <sup>y,a</sup>	35,62 <sup>b</sup>	2,89		
	PLUR	CTRL	20,90 <sup>ab</sup>	20,30 <sup>ab</sup>	19,15 <sup>a</sup>	18,80 <sup>a</sup>	20,09 <sup>a</sup>	23,22 <sup>ab</sup>	26,47 <sup>b</sup>	2,02		
		CMP	21,38	20,19	20,25	20,32	20,68	22,47	24,46	2,02		
		SMP	20,39 <sup>bc</sup>	21,91 <sup>abc</sup>	21,34 <sup>abc</sup>	19,60 <sup>c</sup>	21,63 <sup>bc</sup>	26,93 <sup>a</sup>	26,66 <sup>ab</sup>	2,02		

Per quanto riguarda i livelli di ALT (Tabella 4), nel passaggio da T0 a T1, il gruppo CMP presenta un aumento statisticamente significativo del valore di ALT. Nel passaggio da T5 a T6 tutti i gruppi presentano un aumento del valore di ALT.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto: nel passaggio da T5 a T6 le primipare del gruppo CTRL presentano un aumento statisticamente significativo del valore di ALT; nel passaggio da T0 a T1 le pluripare del gruppo CMP presentano una diminuzione del valore di ALT; nel passaggio da T1 a T2 le pluripare del gruppo SMP presentano una diminuzione del valore di ALT.

Per quanto riguarda i valori di AST (Tabella 4): nel passaggio da T1 a T2 il gruppo CTRL presenta un aumento statisticamente significativo, che si continua nel passaggio da T2 a T3, seguito da una

diminuzione nel passaggio da T4 a T5; nel passaggio da T2 a T3 il gruppo SMP presenta un aumento dei valori di AST. A T2, T3, T4 e T5 sono presenti delle differenze statisticamente significative: a T2 il gruppo SMP presenta un valore minore rispetto al gruppo CTRL; a T3, T4 e T5 i gruppi CMP e SMP presentano un valore minore rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto le differenze per ordine di parto: le primipare dei gruppi CTRL e CMP nel passaggio da T1 a T2 presentano un aumento dei valori di AST; l'aumento è presente anche nel passaggio da T2 a T3 per tutti i gruppi, poi seguito da una diminuzione nel passaggio da T3 a T4, che si continua nel passaggio da T4 a T5, ma solamente per il gruppo CTRL; le pluripare dei gruppi CTRL e CMP presentano un aumento statisticamente significativo nel passaggio da T2 a T3, seguito da una diminuzione significativa per il gruppo CMP nel passaggio da T3 a T4 e una diminuzione significativa per il gruppo CTRL nel passaggio da T4 a T5. A T2, T3 e T4 sono presenti delle differenze statisticamente significative: le primipare dei gruppi CMP e SMP a T2 e T4 presentano un valore minore rispetto al gruppo CTRL, mentre a T3 il gruppo CMP presentano un valore minore rispetto i restanti gruppi; le pluripare dei gruppi CMP e SMP a T3 e T4 presentano un valore minore rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto riguarda i valori di GGT (Tabella 4), nel passaggio da T4 a T5 i gruppi CTRL e SMP presentano un aumento statisticamente significativo, nel passaggio da T5 a T6 continua l'aumento per il gruppo SMP e si presenta anche per il gruppo CMP. Al tempo T5 il gruppo CMP presenta un valore statisticamente significativo minore rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto le differenze per ordine di parto: le primipare del gruppo CTRL presentano un aumento significativo nel passaggio da T4 a T5, seguito da una diminuzione nel passaggio da T5 a T6; nell'ultimo passaggio, inoltre, le primipare del gruppo CMP presentano un aumento statisticamente significativo. Le pluripare del gruppo SMP nel passaggio da T4 a T5 presentano un aumento significativo dei valori di GGT. Al tempo T5 le primipare dei gruppi CMP e SMP presentano un valore minore rispetto al gruppo CTRL.

**Tabella 5:** Media, SEM (standard error of the mean, errore standard della media) e p-values interazione Gruppo\*Tempo (G\*T) e interazione Gruppo\*Tempo\*Parity (ordine di parto) (G\*T\*P) di lattato deidrogenasi (LDH), bilirubina totale (BT), insieme alla significatività statistica, ottenute a T0 (14 giorni preparto), T1 (7 giorni preparto), T2 (il giorno del parto), T3 (7 giorni post-parto), T4 (14 giorni post-parto), T5 (28 giorni post-parto) e T6 (55 giorni post-parto). Par: parametro, P: *parity*, ordine di parto, TOT: gruppo totale degli animali, PRIM: primipare del gruppo, PLUR: pluripare del gruppo, CTRL: gruppo di controllo, CMP: gruppo con protocollo preventivo completo, SMP: gruppo con protocollo preventivo semplificato.

Par	P	G	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	SEM	p-values	
											G*T	G*T*P
LDH U/L	TOT	CTRL	1665,08 <sup>a</sup>	1557,61 <sup>a</sup>	1723,11 <sup>ab</sup>	1917,53 <sup>x,b</sup>	1770,90 <sup>ab</sup>	1756,15 <sup>ab</sup>	1680,22 <sup>ab</sup>	108,28	0,022	0,018
		CMP	1770,28 <sup>ab</sup>	1715,55 <sup>bc</sup>	1865,25 <sup>ab</sup>	2011,16 <sup>x,a</sup>	1819,67 <sup>b</sup>	1702,45 <sup>bc</sup>	1610,50 <sup>c</sup>	107,29		
		SMP	1574,78	1558,62	1655,36	1703,88 <sup>y</sup>	1678,95	1575,92	1604,02	107,74		
	PRIM	CTRL	1829,02 <sup>ab</sup>	1723,01 <sup>a</sup>	1921,17 <sup>ab</sup>	2154,07 <sup>x,b</sup>	1848,62 <sup>ab</sup>	1911,16 <sup>ab</sup>	1791,10 <sup>ab</sup>	127,15		
		CMP	1952,96 <sup>ab</sup>	1834,98 <sup>ab</sup>	2071,44 <sup>ab</sup>	2106,13 <sup>xy,a</sup>	1930,84 <sup>ab</sup>	1806,23 <sup>ab</sup>	1675,02 <sup>b</sup>	125,47		
		SMP	1710,10	1696,32	1830,87	1900,18 <sup>y</sup>	1854,95	1672,52	1770,37	126,77		
	PLUR	CTRL	1501,14 <sup>ab</sup>	1392,20 <sup>y,b</sup>	1525,04 <sup>xy,ab</sup>	1680,98 <sup>xy,a</sup>	1693,18 <sup>xy,a</sup>	1601,13 <sup>ab</sup>	1569,34 <sup>ab</sup>	89,26		
		CMP	1587,60 <sup>b</sup>	1596,12 <sup>x,b</sup>	1659,06 <sup>x,b</sup>	1916,20 <sup>x,a</sup>	1708,49 <sup>x,ab</sup>	1598,67 <sup>b</sup>	1545,99 <sup>b</sup>	89,06		
		SMP	1439,46	1420,93 <sup>xy</sup>	1479,85 <sup>y</sup>	1507,57 <sup>y</sup>	1502,96 <sup>y</sup>	1479,31	1437,68	88,72		
BT mg/dL	TOT	CTRL	0,15 <sup>bc</sup>	0,16 <sup>bc</sup>	0,20 <sup>ab</sup>	0,21 <sup>a</sup>	0,21 <sup>a</sup>	0,18 <sup>abc</sup>	0,14 <sup>c</sup>	0,02	0,185	0,122
		CMP	0,16 <sup>a</sup>	0,16 <sup>a</sup>	0,21 <sup>bc</sup>	0,23 <sup>c</sup>	0,19 <sup>abc</sup>	0,18 <sup>ab</sup>	0,17 <sup>ab</sup>	0,02		
		SMP	0,15 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,19 <sup>ab</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,19 <sup>b</sup>	0,20 <sup>b</sup>	0,16 <sup>a</sup>	0,02		
	PRIM	CTRL	0,15	0,18	0,19	0,19	0,19	0,17	0,13	0,03		
		CMP	0,16 <sup>ab</sup>	0,16 <sup>a</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,24 <sup>b</sup>	0,17 <sup>ab</sup>	0,18 <sup>ab</sup>	0,16 <sup>ab</sup>	0,03		
		SMP	0,16	0,16	0,20	0,24	0,17	0,21	0,16	0,03		
	PLUR	CTRL	0,15 <sup>a</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,20 <sup>ab</sup>	0,23 <sup>b</sup>	0,23 <sup>b</sup>	0,18 <sup>ab</sup>	0,15 <sup>a</sup>	0,02		
		CMP	0,16 <sup>a</sup>	0,16 <sup>a</sup>	0,17 <sup>ab</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,21 <sup>ab</sup>	0,19 <sup>ab</sup>	0,18 <sup>ab</sup>	0,02		
		SMP	0,13 <sup>a</sup>	0,14 <sup>a</sup>	0,17 <sup>ab</sup>	0,20 <sup>b</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,19 <sup>ab</sup>	0,16 <sup>ab</sup>	0,02		

Per quanto riguarda i valori di LDH (tabella 5), nel passaggio da T3 a T4, il gruppo CMP presenta una diminuzione statisticamente significativa. Al tempo T3 il gruppo SMP presenta un valore minore statisticamente significativo rispetto ai gruppi CTRL e CMP.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto al tempo T1, T2, T3 e T4 sono presenti delle differenze statisticamente significative: a T3 le primipare e pluripare del gruppo SMP presentano un valore minore rispetto al gruppo CTRL; a T1 le pluripare del gruppo CTRL presentano un valore minore rispetto il gruppo CMP; a T2, T3 e T4 le pluripare del gruppo SMP presentano un valore minore rispetto il gruppo CMP.

Per quanto riguarda i valori medi di BT (tabella 5): nel passaggio da T1 a T2 il gruppo CMP presenta un aumento statisticamente significativo; nel passaggio da T5 a T6 il gruppo SMP presenta una diminuzione.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto: nel passaggio da T1 a T2 le primipare del gruppo CMP presentano un aumento significativo.

**Tabella 6:** Media, SEM (standard error of the mean, errore standard della media) e p-values interazione Gruppo\*Tempo (G\*T) e interazione Gruppo\*Tempo\*Parity (ordine di parto) (G\*T\*P) di albumina (ALB), proteine totali (PT), urea, creatinfosfochinasi (CPK) e creatinina (CREA), insieme alla significatività statistica, ottenute a T0 (14 giorni preparto), T1 (7 giorni preparto), T2 (il giorno del parto), T3 (7 giorni post-parto), T4 (14 giorni post-parto), T5 (28 giorni post-parto) e T6 (55 giorni post-parto). Par: parametro, P: parity, ordine di parto, TOT: gruppo totale degli animali, PRIM: primipare del gruppo, PLUR: pluripare del gruppo, CTRL: gruppo di controllo, CMP: gruppo con protocollo preventivo completo, SMP: gruppo con protocollo preventivo semplificato.

Par.	P	G	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	SEM	p-values	
											G*T	G*T*P
ALB g/L	TOT	CTRL	33,57 <sup>a</sup>	31,77 <sup>ab</sup>	31,64 <sup>x,ab</sup>	30,65 <sup>x,b</sup>	30,91 <sup>x,b</sup>	31,30 <sup>x,ab</sup>	33,01 <sup>a</sup>	1,02	0,001	0,040
		CMP	33,29 <sup>a</sup>	31,80 <sup>b</sup>	33,14 <sup>y,a</sup>	32,14 <sup>y,ab</sup>	31,44 <sup>xy,b</sup>	31,29 <sup>x,b</sup>	32,15 <sup>ab</sup>	1,01		
		SMP	32,09 <sup>a</sup>	31,65 <sup>ab</sup>	32,09 <sup>xy,a</sup>	30,63 <sup>x,b</sup>	32,25 <sup>y,ab</sup>	33,51 <sup>y,a</sup>	33,37 <sup>a</sup>	1,02		
	PRIM	CTRL	33,17 <sup>a</sup>	31,24 <sup>ab</sup>	31,52 <sup>x,ab</sup>	30,17 <sup>b</sup>	30,06 <sup>x,b</sup>	30,74 <sup>x,ab</sup>	32,89 <sup>a</sup>	1,20		
		CMP	33,35 <sup>a</sup>	30,56 <sup>ab</sup>	33,66 <sup>y,a</sup>	31,39 <sup>ab</sup>	30,93 <sup>xy,b</sup>	31,23 <sup>xy,ab</sup>	32,50 <sup>a</sup>	1,18		
		SMP	32,73 <sup>ab</sup>	31,29 <sup>a</sup>	32,37 <sup>xy,ab</sup>	31,11 <sup>a</sup>	33,05 <sup>y,b</sup>	33,78 <sup>y,b</sup>	33,58 <sup>b</sup>	1,20		
	PLUR	CTRL	33,97 <sup>x,a</sup>	32,29 <sup>ab</sup>	31,76 <sup>ab</sup>	31,13 <sup>xy,b</sup>	31,77 <sup>ab</sup>	31,85 <sup>x,ab</sup>	33,13 <sup>x,a</sup>	0,83		
		CMP	33,24 <sup>x</sup>	33,04	32,62	32,89 <sup>y</sup>	31,95	31,35 <sup>x</sup>	31,80 <sup>y</sup>	0,84		
		SMP	31,45 <sup>y,ab</sup>	32,02 <sup>ab</sup>	31,81 <sup>ab</sup>	30,15 <sup>x,b</sup>	31,46 <sup>ab</sup>	33,23 <sup>y,a</sup>	33,15 <sup>x,a</sup>	0,84		
PT g/L	TOT	CTRL	69,41 <sup>b</sup>	64,45 <sup>cd</sup>	59,85 <sup>e</sup>	62,05 <sup>de</sup>	66,54 <sup>bc</sup>	69,72 <sup>b</sup>	75,01 <sup>a</sup>	2,47	0,958	0,791
		CMP	67,96 <sup>bc</sup>	61,01 <sup>d</sup>	62,71 <sup>d</sup>	64,84 <sup>cd</sup>	71,19 <sup>ab</sup>	68,83 <sup>bc</sup>	74,32 <sup>a</sup>	2,43		
		SMP	66,31 <sup>bc</sup>	65,16 <sup>bc</sup>	61,38 <sup>c</sup>	61,61 <sup>c</sup>	68,32 <sup>b</sup>	73,95 <sup>a</sup>	73,72 <sup>a</sup>	2,46		
	PRIM	CTRL	63,34 <sup>bc</sup>	59,56 <sup>bc</sup>	57,30 <sup>c</sup>	60,03 <sup>bc</sup>	65,19 <sup>ab</sup>	68,52 <sup>ab</sup>	72,82 <sup>a</sup>	2,91		
		CMP	62,56 <sup>bc</sup>	54,88 <sup>c</sup>	60,49 <sup>bc</sup>	62,78 <sup>bc</sup>	69,03 <sup>ab</sup>	68,92 <sup>ab</sup>	73,35 <sup>a</sup>	2,87		
		SMP	63,74 <sup>b</sup>	59,87 <sup>b</sup>	60,05 <sup>b</sup>	61,32 <sup>b</sup>	67,80 <sup>ab</sup>	73,90 <sup>a</sup>	73,13 <sup>a</sup>	2,90		
	PLUR	CTRL	75,49 <sup>ab</sup>	69,33 <sup>c</sup>	62,39 <sup>d</sup>	64,08 <sup>d</sup>	67,89 <sup>cd</sup>	70,92 <sup>bc</sup>	77,20 <sup>a</sup>	2,02		
		CMP	73,36 <sup>a</sup>	67,14 <sup>bc</sup>	64,93 <sup>c</sup>	66,89 <sup>bc</sup>	73,35 <sup>a</sup>	68,74 <sup>bc</sup>	75,30 <sup>a</sup>	2,02		
		SMP	68,88 <sup>b</sup>	70,45 <sup>ab</sup>	62,71 <sup>c</sup>	61,89 <sup>c</sup>	68,83 <sup>b</sup>	73,99 <sup>a</sup>	74,31 <sup>a</sup>	2,02		
UREA mg/dL	TOT	CTRL	45,36 <sup>x,a</sup>	40,30 <sup>x,b</sup>	32,42 <sup>c</sup>	27,37 <sup>x,d</sup>	26,04 <sup>x,d</sup>	24,30 <sup>d</sup>	24,88 <sup>d</sup>	2,00	0,000	0,009
		CMP	37,74 <sup>y,a</sup>	35,76 <sup>y,a</sup>	29,84 <sup>b</sup>	24,31 <sup>xy,c</sup>	23,26 <sup>xy,c</sup>	24,34 <sup>c</sup>	25,42 <sup>c</sup>	1,99		
		SMP	37,01 <sup>y,a</sup>	36,26 <sup>xy,a</sup>	30,62 <sup>b</sup>	22,37 <sup>y,c</sup>	22,32 <sup>y,c</sup>	25,19 <sup>c</sup>	25,25 <sup>c</sup>	2,00		
	PRIM	CTRL	47,36 <sup>x,a</sup>	40,27 <sup>x,b</sup>	33,88 <sup>c</sup>	28,81 <sup>x,d</sup>	26,71 <sup>d</sup>	25,70 <sup>d</sup>	26,61 <sup>d</sup>	2,35		
		CMP	37,68 <sup>y,a</sup>	35,24 <sup>y,a</sup>	30,14 <sup>bc</sup>	24,54 <sup>xy,d</sup>	24,08 <sup>d</sup>	25,58 <sup>d</sup>	26,54 <sup>c</sup>	2,35		
		SMP	39,34 <sup>y,a</sup>	37,00 <sup>xy,a</sup>	31,67 <sup>bc</sup>	22,75 <sup>y,d</sup>	22,49 <sup>d</sup>	26,68 <sup>d</sup>	27,01 <sup>c</sup>	2,35		
	PLUR	CTRL	43,36 <sup>x,a</sup>	40,34 <sup>x,a</sup>	30,97 <sup>b</sup>	25,92 <sup>x,c</sup>	25,37 <sup>x,c</sup>	22,90 <sup>c</sup>	23,15 <sup>c</sup>	1,64		
		CMP	37,80 <sup>y,a</sup>	36,29 <sup>y,a</sup>	29,54 <sup>b</sup>	24,08 <sup>xy,c</sup>	22,45 <sup>xy,c</sup>	23,11 <sup>c</sup>	24,30 <sup>c</sup>	1,65		
		SMP	34,67 <sup>y,a</sup>	35,51 <sup>y,a</sup>	29,57 <sup>b</sup>	21,98 <sup>y,c</sup>	22,15 <sup>y,c</sup>	23,70 <sup>c</sup>	23,50 <sup>c</sup>	1,65		
CREA mg/dL	TOT	CTRL	1,23 <sup>a</sup>	1,18 <sup>x,a</sup>	1,21 <sup>a</sup>	1,04 <sup>b</sup>	0,93 <sup>c</sup>	0,90 <sup>c</sup>	0,93 <sup>c</sup>	0,05	0,000	0,093
		CMP	1,20 <sup>a</sup>	1,04 <sup>y,b</sup>	1,14 <sup>a</sup>	1,03 <sup>b</sup>	0,94 <sup>c</sup>	0,85 <sup>d</sup>	0,89 <sup>cd</sup>	0,05		
		SMP	1,13 <sup>a</sup>	1,11 <sup>xy,a</sup>	1,13 <sup>a</sup>	1,01 <sup>b</sup>	0,93 <sup>c</sup>	0,91 <sup>c</sup>	0,91 <sup>c</sup>	0,05		
	PRIM	CTRL	1,27 <sup>a</sup>	1,24 <sup>a</sup>	1,27 <sup>a</sup>	1,02 <sup>b</sup>	0,92 <sup>b</sup>	0,91 <sup>b</sup>	0,95 <sup>b</sup>	0,06		
		CMP	1,22 <sup>a</sup>	1,12 <sup>ab</sup>	1,23 <sup>a</sup>	1,04 <sup>b</sup>	0,94 <sup>bc</sup>	0,87 <sup>c</sup>	0,90 <sup>bc</sup>	0,06		
		SMP	1,15 <sup>a</sup>	1,17 <sup>a</sup>	1,20 <sup>a</sup>	1,03 <sup>b</sup>	0,94 <sup>b</sup>	0,92 <sup>b</sup>	0,92 <sup>b</sup>	0,06		
	PLUR	CTRL	1,19 <sup>a</sup>	1,12 <sup>x,ab</sup>	1,16 <sup>a</sup>	1,06 <sup>b</sup>	0,94 <sup>c</sup>	0,88 <sup>d</sup>	0,91 <sup>cd</sup>	0,04		
		CMP	1,17 <sup>a</sup>	0,96 <sup>y,bc</sup>	1,05 <sup>b</sup>	1,02 <sup>bc</sup>	0,94 <sup>c</sup>	0,82 <sup>d</sup>	0,87 <sup>cd</sup>	0,04		
		SMP	1,10 <sup>a</sup>	1,05 <sup>xy,ab</sup>	1,06 <sup>ab</sup>	0,99 <sup>b</sup>	0,91 <sup>b</sup>	0,90 <sup>b</sup>	0,89 <sup>b</sup>	0,04		
CPK U/L	TOT	CTRL	273,84 <sup>ab</sup>	207,79 <sup>b</sup>	431,60 <sup>a</sup>	236,65 <sup>b</sup>	192,09 <sup>b</sup>	183,84 <sup>b</sup>	186,62 <sup>b</sup>	85,45	0,463	0,062
		CMP	185,55 <sup>b</sup>	203,12 <sup>ab</sup>	326,80 <sup>a</sup>	272,18 <sup>ab</sup>	300,84 <sup>ab</sup>	271,52 <sup>ab</sup>	216,66 <sup>ab</sup>	84,70		
		SMP	204,37 <sup>ab</sup>	201,88 <sup>ab</sup>	323,26 <sup>a</sup>	330,33 <sup>ab</sup>	177,06 <sup>b</sup>	151,77 <sup>b</sup>	188,84 <sup>b</sup>	84,87		
	PRIM	CTRL	367,16 <sup>ab</sup>	211,08 <sup>b</sup>	616,04 <sup>x,a</sup>	305,97 <sup>b</sup>	163,67 <sup>x,b</sup>	206,80 <sup>b</sup>	199,31 <sup>b</sup>	100,67		
		CMP	203,13	187,17	400,81 <sup>y</sup>	280,03	366,35 <sup>y</sup>	250,37	196,97	98,84		
		SMP	223,51	197,55	408,94 <sup>y</sup>	372,43	198,03 <sup>xy</sup>	173,51	194,70	99,86		
	PLUR	CTRL	180,52	204,50	247,16	167,33	220,52	160,88 <sup>xy</sup>	173,93	70,07		
		CMP	167,97	219,07	252,79	264,34	235,33	292,67 <sup>y</sup>	236,34	70,64		
		SMP	185,23 <sup>ab</sup>	206,22 <sup>ab</sup>	237,57 <sup>ab</sup>	288,22 <sup>a</sup>	156,08 <sup>ab</sup>	130,04 <sup>x,b</sup>	182,99 <sup>ab</sup>	69,89		



Per quanto riguarda i valori di albumina (Tabella 6): nel passaggio da T0 a T1 e da T1 a T2 il gruppo CTRL presenta un diminuzione statisticamente significativa seguito da un aumento; da T2 a T3 il gruppo SMP presenta una diminuzione significativa. Al tempo T2, T3, T4 e T5 sono presenti delle differenze statisticamente significative: al tempo T2 il gruppo CMP presenta un valore maggiore rispetto al gruppo CTRL; a T3 il gruppo CMP presenta un valore maggiore rispetto i gruppi CTRL e SMP; a T4 e T5 il gruppo SMP presenta un valore rispettivamente maggiore rispetto il gruppo CTRL e il gruppo CMP.

Per quanto riguarda la differenze per ordine di parto: le primipare del gruppo SMP nel passaggio da T3 a T4 presentano un aumento del valore di albumina. A T0, T3, T4, T5 e T6 sono presenti delle differenze statisticamente significative: a T2 le primipare del gruppo CMP presentano un valore maggiore rispetto al gruppo CTRL; a T4 e T5 le primipare del gruppo SMP presentano un valore maggiore rispetto il gruppo CTRL; a T0 le pluripare del gruppo SMP presentano un valore minore rispetto ai gruppi CTRL e CMP; a T3 le pluripare del gruppo CMP presentano un valore maggiore rispetto al gruppo SMP; a T5 le pluripare del gruppo SMP presentano un valore maggiore rispetto i gruppi CTRL e CMP; a T6 le pluripare del gruppo CMP presentano un valore maggiore rispetto i gruppi CTRL e SMP.

Per quanto riguarda i valore di PT (Tabella 6): nel passaggio da T0 a T1 i gruppi CTRL e CMP presentano una diminuzione statisticamente significativa, che si continua nel passaggio da T1 a T2 per il gruppo CTRL; nel passaggio da T3 a T4 tutti i gruppi presentano un aumento significativo del valore di PT, che si continua per il gruppo CTRL nel passaggio da T5 a T6 e per il gruppo SMP nel passaggio da T4 a T5.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto: le pluripare dei gruppi CTRL e CMP nel passaggio da T0 a T1 presentano un diminuzione statisticamente significativa dei valori di PT, che si continua per il gruppo CTRL ed si presenta per il gruppo SMP nel passaggio da T1 a T2; nel passaggio da T3 a T4 le pluripare dei gruppi CMP e SMP presentano un aumento statisticamente significativo, seguito nel passaggio da T4 a T5 da una diminuzione per il gruppo CMP e un aumento per il gruppo SMP; nel passaggio da T5 a T6 le pluripare dei gruppi CTRL e CMP presentano un aumento dei valori di PT.

Per quanto riguarda i valori di urea (Tabella 6): nel passaggio da T0 a T1 il gruppo CTRL presenta una diminuzione statisticamente significativa, che si continua anche nel passaggio da T1 a T2 e da T2 a T3, dove anche i gruppi CMP e SMP presentano una diminuzione significativa. Al tempo T0, T1, T3 e T4 sono presenti delle differenze statisticamente significative: a T0 i gruppo CMP e SMP presentano

un valore minore rispetto al gruppo CTRL; a T1 il gruppo CMP presenta un valore minore rispetto al gruppo CTRL; a T3 e T4 il gruppo SMP presenta un valore minore rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto: le pluripare del gruppo CTRL nel passaggio da T0 a T1 presentano una diminuzione statisticamente significativa, che si continua anche nel passaggio da T1 a T2 e da T2 a T3, dove anche le primipare e pluripare dei gruppi CMP e SMP presentano una diminuzione significativa; nel passaggio da T5 a T6 le primipare dei gruppi CMP e SMP presentano un aumento di valori di urea. Al tempo T0, T1, T3 e T4 sono presenti delle differenze statisticamente significative: a T0 le primipare e pluripare dei gruppi CMP e SMP presentano un valore minore rispetto al gruppo CTRL; a T1 le primipare del gruppo CMP e le pluripare dei gruppi CMP e SMP presentano un valore minore rispetto al gruppo CTRL; a T3 le primipare e pluripare del gruppo SMP presentano un valore minore rispetto al gruppo CTRL; a T4 le pluripare del gruppo SMP presentano un valore minore rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto riguarda i valori di CPK (tabella 6): nel passaggio da T1 a T2 il gruppo CTRL presenta un aumento statisticamente significativo, seguito da una diminuzione nel passaggio da T2 a T3.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto: le primipare del gruppo CTRL presentano un aumento nel passaggio da T1 a T2. A T2, T4 e T5 sono presenti delle differenze statisticamente significative: a T2 le primipare dei gruppi CMP e SMP presentano valori minore rispetto al gruppo CTRL; a T4 le primipare del gruppo CMP presentano un valore maggiore rispetto al gruppo CTRL; a T5 le pluripare del gruppo CMP presentano un valore maggiore rispetto al gruppo SMP.

Per quanto riguarda i valori di creatinina (Tabella 7): nel passaggio da T0 a T1 il gruppo CMP presenta una diminuzione statisticamente significativa, seguito da un aumento da T1 a T2, una diminuzione da T2 a T3, che si continua anche da T3 a T4 e da T4 a T5. Per i gruppi CTRL e SMP è presente una diminuzione da T2 a T3, che si continua da T3 a T4. Il gruppo CMP al tempo T1 presenta un valore minore statisticamente significativo rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto: le primipare di tutti i gruppi nel passaggio da T2 a T3 presentano una diminuzione statisticamente significativa del valore di creatinina; le pluripare del gruppo CMP presentano una diminuzione nel passaggio da T0 a T1; le pluripare del gruppo CTRL nel passaggio da T2 a T3 presentano una diminuzione, che si continua nel passaggio da T3 a T4 e da T4 a T5; in quest'ultima anche le pluripare del gruppo CMP presentano una diminuzione. Nel tempo T1 le pluripare del gruppo CMP presentano un valore minore statisticamente significativo rispetto al gruppo CTRL.

**Tabella 7:** Media, SEM (standard error of the mean, errore standard della media) e p-values interazione Gruppo\*Tempo (G\*T) e interazione Gruppo\*Tempo\*Parity (ordine di parto) (G\*T\*P) di fosfatasi alcalina (ALP), calcio (Ca) e magnesio (Mg), insieme alla significatività statistica, ottenute a T0 (14 giorni preparto), T1 (7 giorni preparto), T2 (il giorno del parto), T3 (7 giorni post-parto), T4 (14 giorni post-parto), T5 (28 giorni post-parto) e T6 (55 giorni post-parto). Par: parametro, P: *parity*, ordine di parto, TOT: gruppo totale degli animali, PRIM: primipare del gruppo, PLUR: pluripare del gruppo, CTRL: gruppo di controllo, CMP: gruppo con protocollo preventivo completo, SMP: gruppo con protocollo preventivo semplificato.

Par.	G	P	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	SEM	p-values	
											G*T	G*T*P
ALP U/L	TOT	CTRL	134,13 <sup>ab</sup>	119,87 <sup>ac</sup>	138,77 <sup>x,b</sup>	110,95 <sup>cd</sup>	97,04 <sup>c</sup>	100,97 <sup>c</sup>	121,71 <sup>ad</sup>	13,07	0,000	0,004
		CMP	161,49 <sup>a</sup>	142,20 <sup>b</sup>	191,43 <sup>y,c</sup>	127,67 <sup>bd</sup>	111,72 <sup>d</sup>	109,48 <sup>d</sup>	122,22 <sup>bd</sup>	13,01		
		SMP	153,12 <sup>a</sup>	145,98 <sup>ab</sup>	181,41 <sup>y,c</sup>	121,10 <sup>d</sup>	116,85 <sup>d</sup>	117,43 <sup>d</sup>	127,85 <sup>bd</sup>	13,08		
	PRIM	CTRL	177,21 <sup>a</sup>	154,94 <sup>ab</sup>	181,70 <sup>x,a</sup>	136,80 <sup>bc</sup>	116,14 <sup>c</sup>	121,05 <sup>c</sup>	144,27 <sup>b</sup>	15,38		
		CMP	211,88 <sup>a</sup>	182,87 <sup>b</sup>	257,02 <sup>y,c</sup>	151,58 <sup>bd</sup>	133,57 <sup>e</sup>	136,51 <sup>e</sup>	147,81 <sup>de</sup>	15,25		
		SMP	195,89 <sup>a</sup>	190,59 <sup>a</sup>	242,24 <sup>y,b</sup>	147,78 <sup>c</sup>	140,90 <sup>c</sup>	138,56 <sup>c</sup>	154,07 <sup>c</sup>	15,41		
	PLUR	CTRL	91,06	84,81	95,85	85,10	77,94	80,89	99,15	10,76		
		CMP	111,10 <sup>ab</sup>	101,53 <sup>ac</sup>	125,85 <sup>b</sup>	103,75 <sup>ac</sup>	89,86 <sup>c</sup>	82,45 <sup>c</sup>	96,63 <sup>c</sup>	10,75		
		SMP	110,35 <sup>ab</sup>	101,37 <sup>ab</sup>	120,58 <sup>a</sup>	94,42 <sup>b</sup>	92,81 <sup>b</sup>	96,30 <sup>b</sup>	101,63 <sup>ab</sup>	10,74		
Ca mg/dL	TOT	CTRL	9,40 <sup>x,a</sup>	9,15 <sup>ab</sup>	7,47 <sup>x,d</sup>	8,37 <sup>x,c</sup>	8,67 <sup>bc</sup>	8,83 <sup>bc</sup>	9,57 <sup>a</sup>	0,34	0,000	0,036
		CMP	8,84 <sup>xy,a</sup>	8,59 <sup>ab</sup>	8,05 <sup>y,b</sup>	9,07 <sup>y,a</sup>	9,20 <sup>a</sup>	8,78 <sup>a</sup>	9,19 <sup>a</sup>	0,34		
		SMP	9,10 <sup>y,b</sup>	9,15 <sup>ab</sup>	7,98 <sup>xy,c</sup>	8,73 <sup>xy,c</sup>	9,12 <sup>ab</sup>	9,03 <sup>ab</sup>	9,39 <sup>a</sup>	0,34		
	PRIM	CTRL	9,48 <sup>ab</sup>	9,26 <sup>ab</sup>	8,51 <sup>b</sup>	8,49 <sup>b</sup>	8,53 <sup>b</sup>	8,68 <sup>b</sup>	9,89 <sup>a</sup>	0,40		
		CMP	8,82	8,54	8,61	9,10	9,29	8,92	8,80	0,40		
		SMP	9,07	9,17	8,59	8,56	9,47	9,01	9,50	0,40		
	PLUR	CTRL	9,33 <sup>a</sup>	9,04 <sup>ab</sup>	6,44 <sup>x,c</sup>	8,25 <sup>x,b</sup>	8,81 <sup>ab</sup>	8,97 <sup>ab</sup>	9,24 <sup>a</sup>	0,28		
		CMP	8,85 <sup>a</sup>	8,64 <sup>a</sup>	7,50 <sup>y,b</sup>	9,04 <sup>y,a</sup>	9,10 <sup>a</sup>	8,65 <sup>a</sup>	9,58 <sup>a</sup>	0,28		
		SMP	9,12 <sup>ab</sup>	9,13 <sup>ab</sup>	7,36 <sup>y,c</sup>	8,90 <sup>y,ab</sup>	8,76 <sup>b</sup>	9,04 <sup>ab</sup>	9,28 <sup>a</sup>	0,28		
Mg mg/dL	TOT	CTRL	2,43 <sup>c</sup>	2,70 <sup>x,b</sup>	2,89 <sup>x,a</sup>	2,42 <sup>c</sup>	2,49 <sup>x,c</sup>	2,64 <sup>xy,bc</sup>	2,71 <sup>x,b</sup>	0,09	0,000	0,081
		CMP	2,36 <sup>bc</sup>	2,41 <sup>y,bc</sup>	2,65 <sup>y,a</sup>	2,30 <sup>c</sup>	2,31 <sup>x,c</sup>	2,47 <sup>x,abc</sup>	2,50 <sup>y,ab</sup>	0,09		
		SMP	2,30 <sup>c</sup>	2,83 <sup>x,ab</sup>	2,89 <sup>x,a</sup>	2,37 <sup>c</sup>	2,69 <sup>y,b</sup>	2,78 <sup>y,ab</sup>	2,72 <sup>x,ab</sup>	0,09		
	PRIM	CTRL	2,43 <sup>b</sup>	2,69 <sup>xy,ab</sup>	2,90 <sup>a</sup>	2,45 <sup>b</sup>	2,56 <sup>xy,ab</sup>	2,70 <sup>ab</sup>	2,77 <sup>ab</sup>	0,11		
		CMP	2,44 <sup>ab</sup>	2,37 <sup>y,b</sup>	2,69 <sup>a</sup>	2,34 <sup>b</sup>	2,35 <sup>y,b</sup>	2,54 <sup>ab</sup>	2,54 <sup>ab</sup>	0,11		
		SMP	2,36 <sup>b</sup>	2,83 <sup>x,a</sup>	2,86 <sup>a</sup>	2,39 <sup>b</sup>	2,79 <sup>x,a</sup>	2,84 <sup>a</sup>	2,75 <sup>a</sup>	0,11		
	PLUR	CTRL	2,43 <sup>c</sup>	2,71 <sup>y,ab</sup>	2,88 <sup>y,a</sup>	2,39 <sup>c</sup>	2,43 <sup>xy,c</sup>	2,58 <sup>xy,bc</sup>	2,66 <sup>b</sup>	0,08		
		CMP	2,29 <sup>b</sup>	2,46 <sup>x,ab</sup>	2,62 <sup>x,a</sup>	2,26 <sup>b</sup>	2,28 <sup>x,b</sup>	2,41 <sup>x,ab</sup>	2,45 <sup>ab</sup>	0,08		
		SMP	2,24 <sup>c</sup>	2,83 <sup>y,ab</sup>	2,93 <sup>y,a</sup>	2,34 <sup>c</sup>	2,59 <sup>y,b</sup>	2,73 <sup>y,ab</sup>	2,69 <sup>b</sup>	0,08		

Per quanto riguarda i valori di ALP (Tabella 7) nel passaggio da T0 a T1, il gruppo CMP presenta una diminuzione statisticamente significativa dei valori di ALP. Nel passaggio da T1 a T2 tutti i gruppi presentano un aumento statisticamente significativo seguito da una diminuzione nel passaggio da T2 a T3. Nel passaggio da T5 a T6 il gruppo CTRL presenta un aumento significativo dei valori di ALP. Al tempo T2 i gruppi CMP e SMP presentano un valore maggiore statisticamente significativo rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto: le primipare del gruppo CTRL nel passaggio da T2 a T3 presentano una diminuzione significativa del valore, seguito da un aumento nel passaggio da T5 a T6; le primipare del gruppo CMP presentano una diminuzione del valore nel passaggio da T0 a T1, seguito da un aumento da T1 a T2, seguito da una diminuzione da T2 a T3, che si continua da

T3 a T4; le primipare del gruppo SMP e le pluripare del gruppo CMP; le pluripare del gruppo SMP presentano una diminuzione nel passaggio da T2 a T3. Al tempo T2 le pluripare dei gruppo CMP e SMP presentano valori maggiori statisticamente significativi rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto riguarda i valori di calcio (Tabella 7): nel passaggio da T1 a T2 i gruppi CTRL e SMP presentano una diminuzione statisticamente significativa, seguito da un aumento nel passaggio da T2 a T3 per il gruppo CTRL, dove anche il gruppo CMP presenta un aumento, e un aumento nel passaggio da T3 a T4 per il gruppo SMP; nel passaggio da T5 a T6 il gruppo CTRL presenta un aumento statisticamente significativo. A T0, T2, T3 sono presenti differenze statisticamente significative: a T0 il gruppo CMP presenta un valore minore rispetto al gruppo CTRL; a T2 e T3 il gruppo CMP presenta un valore maggiore rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto: le pluripare di tutti i gruppi nel passaggio da T1 a T2 presentano una diminuzione, seguito da un aumento nel passaggio da T2 a T3. A T2 e T3 sono presenti differenze statisticamente significative: le pluripare dei gruppi CMP e SMP presentano un valore maggiore rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto riguarda i valori di magnesio (Tabella 7): nel passaggio da T0 a T1 i gruppi CTRL e SMP presentano un aumento statisticamente significativo, che si continua nel passaggio da T1 a T2 per il gruppo CTRL e si presenta anche per il gruppo CMP; nel passaggio da T1 a T2 tutti i gruppi presentano una diminuzione del valore di magnesio; il gruppo SMP nel passaggio da T2 a T3 presenta un aumento significativo. Al tempo T1, T2, T4, T5 e T6 sono presenti delle differenze statisticamente significative: a T1 e T2 il gruppo CMP presenta un valore minore rispetto ai gruppi CTRL e SMP; a T4 e T5 il gruppo SMP presenta un valore maggiore rispettivamente in confronto ai gruppi CTRL e CMP e in confronto al gruppo CMP; a T6 il gruppo CMP presenta un valore minore rispetto ai gruppi CTRL e SMP.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto: le primipare del gruppo SMP e le pluripare dei gruppi CTRL e SMP nel passaggio da T0 a T1 presentano un aumento statisticamente significativo; le primipare del gruppo CMP nel passaggio da T1 a T2 presentano un aumento, seguito da una diminuzione nel passaggio T2 a T3, che si presenta anche per le primipare e pluripare degli altri gruppi; nel passaggio da T3 a T4 le primipare e pluripare del gruppo SMP presentano un aumento statisticamente significativo dei valori di magnesio. Al tempo T1, T2, T4 e T5 sono presenti differenze statisticamente significative: a T1 e T4 le primipare del gruppo CMP presentano valori minori rispetto al gruppo SMP; a T1 e T2 le pluripare dei gruppi CTRL e SMP presentano valori maggiori

rispetto al gruppo CMP; a T4 e T5 le pluripare del gruppo SMP presentano valori rispetto al gruppo CMP.

**Tabella 8:** Media, SEM (standard error of the mean, errore standard della media) e p-values interazione Gruppo\*Tempo (G\*T) e interazione Gruppo\*Tempo\*Parity (ordine di parto) (G\*T\*P) di potassio (K), sodio (Na) e cloro (Cl), insieme alla significatività statistica, ottenute a T0 (14 giorni preparto), T1 (7 giorni preparto), T2 (il giorno del parto), T3 (7 giorni post-parto), T4 (14 giorni post-parto), T5 (28 giorni post-parto) e T6 (55 giorni post-parto). Par: parametro, P: parity, ordine di parto, TOT: gruppo totale degli animali, PRIM: primipare del gruppo, PLUR: pluripare del gruppo, CTRL: gruppo di controllo, CMP: gruppo con protocollo preventivo completo, SMP: gruppo con protocollo preventivo semplificato.

Par.	P	G	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	SEM	p-values	
											G*T	G*T*P
K mEq/L	TOT	CTRL	4,53 <sup>ab</sup>	4,40 <sup>y,b</sup>	4,21 <sup>y,bc</sup>	4,15 <sup>y,c</sup>	4,57 <sup>ab</sup>	4,69 <sup>ab</sup>	4,84 <sup>a</sup>	0,16	0,040	0,092
		CMP	4,62	4,78 <sup>x</sup>	4,53 <sup>x</sup>	4,48 <sup>x</sup>	4,65	4,73	4,70	0,16		
		SMP	4,43 <sup>ab</sup>	4,70 <sup>xy,a</sup>	4,45 <sup>xy,ab</sup>	4,25 <sup>xy,b</sup>	4,49 <sup>ab</sup>	4,62 <sup>a</sup>	4,72 <sup>a</sup>	0,16		
	PRIM	CTRL	4,74 <sup>ab</sup>	4,45 <sup>bc</sup>	4,20 <sup>bc</sup>	4,11 <sup>c</sup>	4,56 <sup>ab</sup>	4,72 <sup>ab</sup>	4,94 <sup>a</sup>	0,19		
		CMP	4,71	4,66	4,54	4,45	4,64	4,71	4,81	0,18		
		SMP	4,60 <sup>a</sup>	4,71 <sup>a</sup>	4,37 <sup>ab</sup>	4,18 <sup>b</sup>	4,50 <sup>ab</sup>	4,64 <sup>a</sup>	4,76 <sup>a</sup>	0,19		
	PLUR	CTRL	4,33 <sup>ab</sup>	4,35 <sup>x,ab</sup>	4,22 <sup>x,b</sup>	4,19 <sup>x,b</sup>	4,58 <sup>a</sup>	4,66 <sup>a</sup>	4,74 <sup>a</sup>	0,13		
		CMP	4,53 <sup>b</sup>	4,89 <sup>y,a</sup>	4,51 <sup>y,b</sup>	4,51 <sup>y,b</sup>	4,66 <sup>ab</sup>	4,75 <sup>ab</sup>	4,59 <sup>b</sup>	0,13		
		SMP	4,25 <sup>c</sup>	4,70 <sup>y,a</sup>	4,53 <sup>y,ab</sup>	4,31 <sup>xy,bc</sup>	4,49 <sup>ab</sup>	4,60 <sup>a</sup>	4,68 <sup>a</sup>	0,13		
Na mmol/L	TOT	CTRL	139,08 <sup>a</sup>	137,83 <sup>x,a</sup>	137,06 <sup>x,a</sup>	130,43 <sup>x,b</sup>	139,58 <sup>a</sup>	139,43 <sup>a</sup>	140,74 <sup>a</sup>	1,94	0,000	0,036
		CMP	141,35 <sup>ab</sup>	145,14 <sup>y,a</sup>	145,15 <sup>y,a</sup>	142,06 <sup>z,ab</sup>	138,29 <sup>bc</sup>	137,79 <sup>c</sup>	137,31 <sup>c</sup>	1,94		
		SMP	140,31 <sup>bc</sup>	144,06 <sup>y,ab</sup>	144,89 <sup>y,a</sup>	136,45 <sup>y,c</sup>	136,52 <sup>c</sup>	137,27 <sup>c</sup>	138,79 <sup>c</sup>	1,94		
	PRIM	CTRL	139,17 <sup>ab</sup>	136,99 <sup>x,b</sup>	140,68 <sup>x,ab</sup>	129,22 <sup>x,c</sup>	140,25 <sup>ab</sup>	140,05 <sup>ab</sup>	141,71 <sup>a</sup>	2,28		
		CMP	142,28 <sup>ab</sup>	144,09 <sup>y,a</sup>	146,48 <sup>y,a</sup>	142,25 <sup>z,ab</sup>	137,25 <sup>c</sup>	138,63 <sup>bc</sup>	136,99 <sup>c</sup>	2,27		
		SMP	142,98 <sup>ab</sup>	143,65 <sup>y,ab</sup>	145,55 <sup>y,a</sup>	136,69 <sup>y,c</sup>	137,01 <sup>c</sup>	135,84 <sup>c</sup>	138,96 <sup>bc</sup>	2,28		
	PLUR	CTRL	138,98 <sup>a</sup>	138,68 <sup>x,a</sup>	133,45 <sup>x,b</sup>	131,64 <sup>x,b</sup>	138,91 <sup>a</sup>	138,81 <sup>a</sup>	139,77 <sup>a</sup>	1,61		
		CMP	142,41 <sup>b</sup>	146,20 <sup>y,a</sup>	143,81 <sup>y,ab</sup>	141,86 <sup>z,b</sup>	139,33 <sup>bc</sup>	136,96 <sup>c</sup>	137,62 <sup>c</sup>	1,61		
		SMP	137,65 <sup>b</sup>	144,48 <sup>y,a</sup>	144,23 <sup>y,a</sup>	136,21 <sup>y,b</sup>	136,02 <sup>b</sup>	138,70 <sup>b</sup>	138,62 <sup>b</sup>	1,60		
Cl mEq/L	TOT	CTRL	102,95 <sup>a</sup>	103,37 <sup>x,a</sup>	99,37 <sup>z,b</sup>	91,68 <sup>y,c</sup>	93,20 <sup>cd</sup>	95,02 <sup>d</sup>	94,68 <sup>d</sup>	1,52	0,000	0,025
		CMP	101,21 <sup>c</sup>	105,18 <sup>x,b</sup>	108,83 <sup>x,a</sup>	96,03 <sup>x,d</sup>	94,22 <sup>de</sup>	93,56 <sup>e</sup>	94,04 <sup>de</sup>	1,52		
		SMP	102,08 <sup>c</sup>	108,94 <sup>y,a</sup>	105,47 <sup>y,b</sup>	94,95 <sup>x,d</sup>	94,73 <sup>d</sup>	93,24 <sup>d</sup>	92,80 <sup>d</sup>	1,52		
	PRIM	CTRL	103,78 <sup>a</sup>	102,56 <sup>a</sup>	100,33 <sup>x,a</sup>	90,99 <sup>b</sup>	94,19 <sup>b</sup>	94,97 <sup>b</sup>	94,01 <sup>b</sup>	1,79		
		CMP	101,91 <sup>b</sup>	105,37 <sup>ab</sup>	108,99 <sup>y,a</sup>	96,59 <sup>c</sup>	93,90 <sup>c</sup>	93,38 <sup>c</sup>	94,47 <sup>c</sup>	1,78		
		SMP	104,31 <sup>a</sup>	108,04 <sup>a</sup>	105,42 <sup>xy,a</sup>	95,07 <sup>b</sup>	94,96 <sup>b</sup>	93,14 <sup>b</sup>	93,46 <sup>b</sup>	1,79		
	PLUR	CTRL	102,11 <sup>ab</sup>	104,18 <sup>x,a</sup>	98,40 <sup>x,bc</sup>	92,37 <sup>d</sup>	92,21 <sup>d</sup>	95,07 <sup>cd</sup>	95,34 <sup>cd</sup>	1,25		
		CMP	100,51 <sup>c</sup>	105,00 <sup>x,b</sup>	108,66 <sup>y,a</sup>	95,46 <sup>d</sup>	94,55 <sup>de</sup>	93,74 <sup>e</sup>	93,61 <sup>e</sup>	1,26		
		SMP	99,85 <sup>c</sup>	109,84 <sup>y,a</sup>	105,53 <sup>y,b</sup>	94,83 <sup>d</sup>	94,50 <sup>d</sup>	93,34 <sup>d</sup>	92,13 <sup>d</sup>	1,25		

Per quanto riguarda i valori di potassio (Tabella 8): nel passaggio da T3 a T4 il gruppo CTRL presenta un aumento statisticamente significativo. Al tempo T1, T2 e T3 il gruppo CTRL presenta un valore minore statisticamente significativo rispetto al gruppo CMP.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto: nel passaggio da T3 a T4 le primipare e pluripare del gruppo CTRL presentano un aumento del valore di potassio; nel passaggio da T0 a T1 i gruppi CMP e SMP presentano un aumento, seguito da una diminuzione significativa solamente per il gruppo CMP nel passaggio da T1 a T2. Al tempo T1, T2 e T3 sono presenti delle differenze

statisticamente significative: a T1 e T2 i gruppi CMP e SMP presentano un valore maggiore rispetto al gruppo CTRL; a T3 il gruppo CMP presentano un valore maggiore rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto riguarda i valori di sodio (Tabella 8): nel passaggio da T2 a T3 il gruppo CTRL presenta una diminuzione statisticamente significativa, seguita da un aumento nel passaggio da T3 a T4. Al tempo T1, T2 e T3 sono presenti delle differenze statisticamente significative: a T1 e T2 i gruppi CMP e SMP presentano un valore maggiore rispetto al gruppo CTRL; a T3 il gruppo CMP presenta un valore maggiore rispetto ai gruppi CTRL e SMP e il gruppo SMP presenta un valore maggiore rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto: le primipare dei gruppi CTRL e SMP nel passaggio da T2 a T3 presentano una diminuzione statisticamente significativa, che continua solo per il gruppo CTRL e si presenta per il B nel passaggio da T3 a T4; le pluripare dei gruppi CMP e SMP nel passaggio da T0 a T1 presentano un aumento dei valori di sodio, che si continua nel passaggio da T2 a T3 solo per il gruppo SMP; le pluripare del gruppo CTRL nel passaggio da T1 a T2 presentano una diminuzione significativa, seguita un aumento nel passaggio da T3 a T4. Nel tempo T1, T2 e T3 sono presenti delle differenze statisticamente significative: le primipare e pluripare dei gruppi CMP e SMP presentano un valore maggiore rispetto al gruppo CTRL; le primipare e pluripare del gruppo CMP presentano un valore maggiore rispetto ai gruppi CTRL e SMP e le primipare e pluripare del gruppo SMP presentano un valore maggiore rispetto al gruppo CTRL.

Per quanto riguarda i valori del cloro (Tabella 8): nel passaggio da T0 a T1 i gruppi CMP e SMP presentano un aumento statisticamente significativo, che continua con un aumento per il gruppo CMP e una diminuzione per il gruppo SMP nel passaggio da T1 a T2. Nello stesso passaggio anche il gruppo CTRL presenta una diminuzione del valore di cloro. In seguito per tutti i gruppi è presente una diminuzione nel passaggio da T2 a T3. Al tempo T1, T2 e T3 sono presenti delle differenze statisticamente significative: a T1 il gruppo SMP presenta un valore maggiore rispetto ai gruppi CTRL e CMP; a T2 il gruppo CTRL presenta un valore minore rispetto a CMP e SMP e il gruppo CMP un valore minore rispetto a SMP; a T3 il gruppo CTRL presenta un valore minore rispetto a CMP e SMP. Per quanto riguarda le differenze per ordine di parto: le pluripare dei gruppi CMP e SMP nel passaggio da T0 a T1 presentano un aumento statisticamente significativo, che continua con un aumento per il gruppo CMP e una diminuzione per il gruppo SMP nel passaggio da T1 a T2. Nello stesso passaggio anche il gruppo CTRL presenta una diminuzione. In seguito per primipare e pluripare di tutti i gruppi è presente una diminuzione del valore di cloro. Al tempo T1 e T2 sono presenti delle differenze statisticamente significative: a T1 le pluripare del gruppo SMP presenta un

valore maggiore rispetto ai gruppi CTRL e CMP, a T2 le pluripare dei gruppi CMP e SMP e le primipare del gruppo CMP presentano un valore maggiore rispetto il gruppo CTRL.

## 4.2. Parametri e rilievi clinici

I dati su parametri produttivi e riproduttivi, e rilievi clinici sono riassunti nella tabella sottostante.

**Tabella 9:** Medie dei parametri produttivi e riproduttivi (media di giorni di lattazione – *days in milk* – DIM, giorni di asciutta, litri di colostro, indice BRIX e numero di inseminazioni per gravidanza) e rilievi clinici (definiti come valore assoluto: gemelli, nati morti; come valore medio per animale di casi clinici in lattazione; come incidenza per le patologie). I dati sono riferiti al gruppo controllo (CTRL), gruppo con protocollo preventivo completo (CMP) e gruppo con protocollo preventivo semplificato (SMP).

GRUPPO	CTRL	CMP	SMP
DIM ad inizio asciutta	330,2	322,2	338,9
Giorni di asciutta	62,23	59,56	60,73
Litri di colostro	3	4	3
Indice BRIX	19	19,7	19,5
Numero di inseminazioni per gravidanza	2	2	2
Gemelli	0	2	0
Nati morti	1	1	1
Casi clinici in lattazione	1	1	1
Ritenzione placentare (entro le 24 ore)	10%	8,2%	5,8%
Mastite	18,4%	3,7%	9,6%
Chetosi (>1 ng/mL, dato ottenuto in sala mungitura)	35,2%	20,4%	34,6%
Metrite acuta (trattata)	15,6%	8,2%	11,5%
Laminite	55,6%	44,9%	38,5%

Nel corso del periodo di studio sono state riscontrate delle differenze: nel gruppo CMP si sono presentati due casi di gemelli al parto; il colostro prodotto è stato maggiore nel gruppo CMP, come anche l'indice BRIX. In ogni gruppo il valore medio di caso clinico durante la lattazione è stato di uno: il gruppo CTRL ha presentato la maggior incidenza di ritenzione placentare, mastite, chetosi, metrite e laminite. Queste patologie si sono presentate da incidenza maggiore a minore con ordine CTRL, SMP e CMP per mastite e chetosi; invece, per ritenzione placentare e laminite si sono presentate con ordine CTRL, CMP e SMP. In ogni gruppo si è presentato un caso di vitello nato morto e il numero di inseminazioni per gravidanza non ha subito variazioni a seconda del trattamento.

## 5. DISCUSSIONE

### 5.1. Profilo energetico

Durante il periodo di transizione la bovina incorre nel fenomeno di omeoresi (Martens, 2020), che porta a prioritizzare le riserve energetiche per lo sviluppo fetale, lo sviluppo mammario e la produzione di latte. Il glucosio viene quindi indirizzato a compartimenti specifici, ma le ingenti richieste portano a uno stato di NEB che si presenta con abbassamento delle concentrazioni di glucosio e variazioni di altri metaboliti. In accordo con quanto appena detto, le concentrazioni di glucosio nel presente studio hanno presentato un trend simile in tutti e 3 gruppi: aumentano il giorno del parto, con successiva diminuzione a 7 giorni post-parto. Per le primipare l'aumento al parto è maggiore nel gruppo CMP; mentre nelle pluripare è maggiore nel gruppo SMP. Il calo delle concentrazioni si è dimostrato essere maggiore per il gruppo di controllo e in particolare nelle pluripare, dove tendenzialmente i valori di glucosio risultano più bassi. Questo risultato è in accordo con altri studi: Sun et al. (2016), utilizzando un protocollo differente, ha osservato che attraverso l'utilizzo di metionina *rumen protected* e colina *rumen protected* le concentrazioni di glucosio 7 giorni post-parto tendono ad essere più elevate rispetto al gruppo di controllo; queste differenze tendono ad essere non più presenti a 14 e 21 giorni post-parto, dato che è possibile osservare anche 14 e 28 giorni post-parto nel presente studio; nello studio di Fiore et al. (2021) il gruppo SUPP, ricevente lo stesso trattamento di CMP, ha presentato concentrazioni di glucosio maggiori nel tempo rispetto al gruppo di controllo. La cianocobalamina, presente nei trattamenti di entrambi i gruppi è in grado di aumentare il tasso di gluconeogenesi epatica; Graulet et al. (2007) ha infatti osservato come il supplemento di vitamina B12 è in grado di aumentare la concentrazione di glucosio.

Oltre al glucosio, i principali metaboliti che presentano variazioni durante il NEB sono i NEFA e BHB. L'aumento dei NEFA è indice di lipomobilizzazione (De Koster and Opsomer, 2013). Nel presente studio è possibile osservare come al parto l'aumento sia presente in tutti i gruppi di trattamento; a 7 giorni post-partum il valore continua ad aumentare solo per il gruppo di controllo e tende a rimanere più elevato rispetto a CMP e SMP; i trattamenti sono dunque efficaci a mantenere un tasso di lipomobilizzazione più basso. Fiore et al. (2016), utilizzando un protocollo diverso costituito solo da acetilmetionina, cianocobalamina and acido  $\alpha$ -lipoico, ha riscontrato la diminuzione del valore di NEFA dopo il parto per entrambi i gruppi sperimentali, ma per il gruppo trattato il cambiamento era maggiormente pronunciato. La diminuzione è stata riscontrata anche in un altro studio di Fiore et



al. (2021), dove il gruppo trattato, ha ricevuto lo stesso protocollo di CMP, indicando che la mobilizzazione è stata minore.

Nel fegato, in mancanza di ossalacetato, l'acetyl-CoA derivante dall'ossidazione dei NEFA diventa acetoacetyl-CoA per poi formare i corpi chetonici, tra cui il BHB. Le medie dei differenti gruppi non superano il cut-off di 1 mmol/L e di 1.4 mmol/L (Constable et al., 2017) rispettivamente riferito alla prima e alla seconda settimana post-parto; è evidente la differenza tra gruppo CTRL e i gruppi trattati. Tutti e tre i gruppi presentano infatti un aumento 7 giorni post-parto, ma nelle settimane successive insorge la differenza tra gruppi: il gruppo CTRL presenta valori più alti 4 settimane dopo il parto nelle primipare e 2 settimane dopo il parto nelle pluripare, superando in entrambi i casi il valore di 1 mmol/L. I risultati di questo studio sono coerenti con Fiore et al. (2016, 2021), che prevedevano protocolli differenti, ma i cui risultati mostravano sempre un abbassamento del BHB da 7 giorni post-parto a seguire. L'infusione di glucosio può portare al restauro di un bilancio energetico positivo con conseguente riduzione del tasso di lipomobilizzazione e delle concentrazioni di NEFA e BHB (Fiore et al., 2014); si può quindi dedurre come l'utilizzo dei due protocolli per i gruppi CMP e SMP possa portare beneficio al bilancio energetico dell'animale e influenzare la variazione delle concentrazioni di glucosio, NEFA, BHB, senza particolari differenze tra i gruppi CMP e SMP.

A livello epatico, l'esterificazione degli acidi grassi porta alla formazione dei trigliceridi, che vengono o idrolizzati o esportati dal fegato tramite lipoproteine; quando questi fenomeni vengono meno incorre la lipidosi epatica (Grummer, 1993; Bobe et al., 2004). In questo studio è presente un diminuzione dei valori di trigliceridi plasmatici il giorno del parto, senza distinzione tra i gruppi sperimentali. Non è presente rilevanza significativa nell'interazione gruppo-tempo ( $p > 0.05$ ) o in quella gruppo-tempo-ordine di parto ( $p > 0.05$ ), ma l'abbassamento del valore è coerente con quello di altri studi (Arfuso et al., 2016; Fiore et al., 2021). Il colesterolo totale tende ad aumentare a 7 giorni preparto, per poi diminuire il giorno del parto. In seguito aumenta in tutti i gruppi più ci si allontana dal parto. L'aumento del valore nelle primipare è più lento rispetto alle pluripare. L'aumento costante del colesterolo nelle settimane post-parto è in accordo con lo studio di Fiore et al. (2016); infatti una maggiore concentrazione di colesterolo totale riflette un aumento dell'esportazione degli acidi grassi dal fegato, che diminuisce lo sviluppo della lipidosi epatica (Mostafavi et al., 2013). Ma siccome nel presente studio non sussistono differenze statisticamente significative tra i gruppi di trattamento, non è possibile confermare l'efficacia dei diversi protocolli nella variazione di questo parametro, in contrasto con quanto riportato da Fiore et al. (2021). I

fosfolipidi presentano una diminuzione della concentrazione al parto, che continua anche nella settimana successiva. Le concentrazioni nel gruppo SMP sono più basse rispetto al gruppo CMP. L'abbassamento dei fosfolipidi è connesso all'abbassamento dei trigliceridi, siccome per l'escrezione epatica tramite VLDL dei trigliceridi sono necessari i fosfolipidi, in particolare la fosfatidilcolina (Zeisel, 2013); questo abbassamento è potenzialmente collegato ad una maggiore attività fosfolipasica che incorre al momento del parto per incrementare l'energia di cui la bovina ha bisogno (Arfuso et al., 2016). La minore concentrazione fosfolipidica nel gruppo SMP può essere dovuto al minore apporto di metionina fornito a questo gruppo, siccome la frequenza di somministrazione nel protocollo preventivo è ridotta rispetto a CMP.

## 5.2. Profilo epatico

Le concentrazioni ematiche di AST, GGT e ALT possono essere indicative di danno epatico (Russell and Roussel, 2007). In questo studio le concentrazioni di ALT sono aumentate solamente a 55 giorni post-parto, senza evidenti variazioni durante il periodo precedente, se non per un aumento nel gruppo CMP a 7 giorni preparto. L'aumento a 55 giorni è parzialmente in accordo con quello visibile nello studio di Fiore et al. (2016), dove ALT aumentava a 30 e 50 giorni post-parto. Non sono evidenziati valori più bassi nei gruppi SMP e CMP, contrariamente a Fiore et al. (2021), che con un protocollo simile ha osservato un valore inferiore per il gruppo SUPP, il gruppo trattato, rispetto al gruppo di controllo, da cui si poteva dedurre un potenziale effetto protettivo del trattamento verso il danno epatico. Infatti il BHB tende a provocare un effetto di stress ossidativo per le cellule epatiche, provocando l'aumento di enzimi epatici, come ALT, ALP e AST (Song et al., 2016). In aggiunta, la deposizione di grasso, quindi l'induzione di lipidosi epatica, provoca sofferenza degli epatociti e l'aumento di AST e GGT (Bobe et al., 2004).

Le concentrazioni di AST, invece, presentano delle variazioni tra i gruppi sperimentali. Infatti, al parto, aumenta in tutti i gruppi ma maggiormente nel gruppo di controllo; questo aumento si continua fino a 7 giorni dopo il parto; in seguito, si ha un decremento. Nelle primipare questo aumento parte il giorno del parto, mentre nelle pluripare è più tardivo, a 7 giorni post-parto. In generale, le concentrazioni nei gruppi SMP e CMP sono più basse del gruppo di controllo nel periodo interessato da aumento e poi diminuzione. Questo riflette un effetto proteggente del trattamento verso il parenchima epatico, come avvenuto in Fiore et al. (2021).

Le concentrazioni di GGT non subiscono elevati cambiamenti al parto, quanto più nelle fasi sperimentali finali; infatti, nel gruppo di controllo GGT presenta un aumento a 28 giorni dal parto,

con valore maggiore rispetto ai gruppi trattati. Osservando le differenze tra primipare e pluripare, si può osservare che sono proprio quest'ultime a presentare l'aumento maggiore a 28 giorni. L'aumento della concentrazione è suggestivo di un potenziale danno epatico (Bobe et al., 2004) nel gruppo di controllo; questo sostiene l'ipotesi che il trattamento possa aver fornito una protezione al parenchima, maggiormente nel gruppo CMP dove i valori di GGT sono tendenzialmente più bassi rispetto a SMP.

Le concentrazioni di LDH non hanno mostrato variazioni importanti durante il periodo sperimentale; tuttavia, in generale i valori nel gruppo SMP sono tendenzialmente più bassi rispetto agli altri gruppi. L'LDH può essere un indicatore di danno epatico (Russell and Roussel, 2007); per questo motivo la tendenza nel gruppo SMP potrebbe essere significativa di una maggiore efficacia del trattamento. La sua relazione con la chetosi è ambigua siccome in uno studio di Li et al. (2016), l'LDH è risultato essere correlato positivamente con BHB e NEFA, quindi indicativo di chetosi, invece Ha et al. (2022), che ha cercato di definire dei biomarker per la prevenzione della chetosi, ha trovato che l'LDH si presenta con un'associazione negativa rispetto alla gravità della chetosi. Infine, LDH può essere considerato come marker di infiammazione, per patologie quali mastite e patologie respiratorie (Klein et al., 2020); quindi la sua concentrazione minore nel gruppo SMP, potrebbe significare un minore stato infiammatorio dell'animale.

La bilirubina totale ha presentato tendenzialmente un aumento al parto e nei primi 7 giorni post-parto, con successivo abbassamento. Questi risultati sono in accordo con Fiore et al. (2016, 2021), che hanno osservato un trend simile, utilizzando un protocollo sperimentale simile; in questi studi citati non si è presentata differenza tra i gruppi sperimentali ( $p > 0.05$ ), come si è visto anche nel presente studio. L'aumento di bilirubina al parto può essere dovuto ad uno stato infiammatorio a cui il fegato va incontro al momento del parto; questo ne riduce le sue funzioni, tra cui la clearance della bilirubina, attraverso l'azione dell'IL-1 sull'espressione di geni per il suo metabolismo (Bionaz et al., 2007).

### 5.3. Profilo metabolico proteico

Le concentrazioni ematiche di albumine, proteine totale, urea, creatinina e CPK sono state valutate come indicatori di metabolismo proteico. Queste hanno subito variazione durante il periodo sperimentale. In primis l'albumina: 7 giorni prima del parto è presente un abbassamento in generale per tutti i gruppi, con successivo aumento su valori che poi restano più o meno stabili. Il gruppo CMP presenta una concentrazione maggiore rispetto agli altri nel momento del parto e 7 giorni dopo;

invece, il gruppo SMP ha concentrazione maggiore a 14 e 28 giorni post-parto. In generale però è il gruppo di controllo a mantenere i valori più bassi. Quest'ultimo risultato è in accordo con Fiore et al. (2021). L'abbassamento dell'albumina potrebbe essere dovuto ad una ridotta produzione di questo a causa di una disfunzione epatica connessa ad una condizione di chetosi o lipidosi epatica (Farag and Metwally, 2012); i risultati sostengono l'ipotesi di una protezione per la produzione di albumina da parte del trattamento fornito ai gruppi CMP e SMP, più evidente nell'immediato dopo parto nel gruppo CMP e tra i 14 e 28 giorni per il gruppo SMP. Inoltre, siccome l'albumina è considerata una proteina di fase acuta (Ritchie et al., 1999), la sua minore concentrazione nel gruppo CTRL, potrebbe essere indicativa di uno stato infiammatorio.

È stato riscontrata una variazione anche per le proteine totali, che tendono a diminuire da 7 giorni prima al giorno del parto, per poi aumentare successivamente senza particolari differenze per il gruppo di trattamento ( $p > 0.05$ ). L'abbassamento delle proteine totali al parto è coerente con quanto riscontrato da Ganesella et al. (2018); Piccione et al. (2011) sostiene che l'abbassamento è dovuto per lo più a una diminuzione di globuline, invece che di albumine, come è possibile osservare nel presente studio.

Le variazioni delle concentrazioni di urea si sono presentate 7 giorni preparto, dove è presente un abbassamento, soprattutto per le pluripare del gruppo di controllo; questa diminuzione continua anche al parto fino a 7 giorni dopo, quando si assestano. Inoltre, nel gruppo di controllo, in questo periodo, i valori sono più alti rispetto ai gruppi trattati. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da Fiore et al. (2021). L'inefficienza epatica che si verifica in post-parto può portare a diminuzione della clearance dell'urea (Wathes et al., 2007); in questo, è supportata l'ipotesi che il trattamento possa essere efficace a mantenere basse le concentrazioni di urea, in particolare il protocollo SMP presenta delle concentrazioni leggermente più basse rispetto a CMP, indicativo di un migliore utilizzo e metabolismo dell'urea. Infine, per aumentare la disponibilità di glucosio, fondamentale nel post-parto per la produzione di latte (De Koster and Opsomer, 2013), viene incrementato il metabolismo degli amminoacidici stoccati nel tessuto muscolare scheletrico e altre proteine, che porta inevitabilmente all'aumento della produzione di urea (Bell, 1995). L'affievolimento delle differenze dai 14 giorni post-parto può essere indice di una ripresa funzionale del fegato.

La creatinina è prodotta dal catabolismo della creatina nel metabolismo muscolare; viene filtrata liberamente dal glomerulo ed escreta nelle urine (Engelking, 2015). In questo studio la creatinemia ha presentato delle variazioni durante il periodo sperimentale, in particolare per il gruppo CMP.

Infatti, per quest'ultimo è presente un forte abbassamento a 7 giorni dal parto, soprattutto nelle pluripare. Inoltre, il suo valore in queste è nettamente più basso rispetto agli altri gruppi. Al parto è presente un aumento delle concentrazioni in tutti i gruppi, seguito da diminuzione a 7 giorni dal parto che è continua gradualmente fino a 55 giorni post-parto. I risultati sono in accordo con Roche et al. (2013) e Spaans et al. (2022); anche in questi studi si è osservato l'abbassamento in post-parto, che è strettamente collegato ai processi proteolitici a livello muscolare. Infatti, Pires et al. (2013) nel suo studio, ha osservato una creatinemia più bassa nei gruppi con BCS più basso, accompagnato da un rapporto 3-metilistidina:creatinina maggiore che suggerisce una mobilitazione proteica muscolare maggiore.

Le concentrazioni di CPK tendono ad aumentare il giorno del parto, ma nettamente solo per il gruppo di controllo, in particolare nella pluripare, dove la concentrazione è infatti superiore a quella dei gruppi trattati. L'incremento al parto, in accordo con lo studio di Spaans et al. (2022), può essere spiegato dai danni provocati al tratto riproduttivo durante il parto; infatti, CPK, in seguito a danno muscolare raggiunge il picco dalle 6 alle 12 ore (Pavlata et al., 2001) dopo e da come si osserva nel presente studio le concentrazioni dai 7 giorni post-parto risultano tornare a livelli tipici del preparto. Il valore di CPK nelle primipare potrebbe essere spiegabile da un maggiore stress che la bovina subisce nella competizione con bovine pluripare (Val-Laillet et al., 2009). Dai risultati si deduce comunque che il trattamento potrebbe avere un effetto benefico nei confronti delle concentrazioni di CPK, ma nel presente studio è stato visibile solo nel momento in cui le concentrazioni sono state più elevate e solamente nelle pluripare.

#### 5.4. Profilo minerale

È stato valutato anche il profilo minerale con i seguenti: ALP, calcio, cloro, magnesio, potassio e sodio. Le concentrazioni di ALP presentano un aumento al momento del parto, soprattutto nelle pluripare. L'aumento nel momento del parto potrebbe essere collegato ad un aumento dell'attività osteoblastica (Mohamed, 2014), infatti Sato et al. (2013) ha riportato che il metabolismo osseo è maggiormente attivo nel periodo di lattazione rispetto al periodo di asciutta. Sette giorni dopo il parto, ALP tende ad abbassarsi per poi risalire a 55 giorni dal parto; questa diminuzione è in linea con quella riscontrata da Chiba et al. (2020), dove il parametro in esame era però l'isoenzima ALP di derivazione osteoblastica, indicativo di una diminuzione della formazione ossea osteoblastica. In generale, nei gruppi SMP e CMP le concentrazioni tendono ad essere più elevate rispetto al gruppo

di controllo; in particolare al parto, da una concentrazione maggiore di ALP si può dedurre una maggiore attività osteoblastica, quindi di formazione ossea.

I livelli di calcio tendenzialmente si abbassano e successivamente si rialzano 7 giorni dopo. L'abbassamento, coerente con lo studio di Spaans et al. (2022), è dovuto all'ingente richiesta di calcio necessaria per la produzione di latte (Goff, 2004); infatti, se i meccanismi di riassorbimento osseo e assorbimento intestinale non sono sufficienti, come accade più spesso nelle pluripare (Van Mosel et al., 1993; DeGaris and Lean, 2008), allora l'animale entra in stato di ipocalcemia (Goff, 2008). Nel presente studio il gruppo di controllo ha presentato i valori più bassi rispetto agli altri, soprattutto nelle pluripare, probabilmente per il motivo sopracitato. Venjakob et al. (2021), nel suo studio, ha valutato la connessione tra le concentrazioni plasmatiche di calcio e l'incidenza di altre patologie della fase di transizione, tra cui la chetosi; ha osservato che in animale chetotici, primipari o multipari, il calcio tende ad essere più basso nel post-parto. Nonostante Rollin et al. (2010), con un protocollo terapeutico costituito da butofosfano e cianocobalamina non abbia osservato variazioni nelle concentrazioni di calcio e fosforo, è comunque possibile dedurre che il protocollo utilizzato nel presente studio possa avere avuto effetti benefici anche sull'equilibrio del calcio, soprattutto nel gruppo CMP al parto e 7 giorni dopo.

Il magnesio ha un trend inverso rispetto al calcio: innalzamento all'avvicinarsi del parto, con picco il giorno del parto e abbassamento in seguito. Questo trend, rilevato anche da Spaans et al. (2022), è significativo di una connessione tra i due minerali: infatti il magnesio è necessario al richiamo del paratormone e l'attivazione della vitamina D (DeGaris and Lean, 2008). Al momento del parto, infatti, quando insorge l'ipocalcemia, tende invece ad aumentare la magnesiemia per un meccanismo di compensazione. Inoltre, è proprio il gruppo CMP a presentare le concentrazioni più basse 7 giorni prima e al parto, dove infatti, come sopracitato, la calcemia è stata maggiore. Il successivo abbassamento a 7 giorni dal parto è coerente con quanto riscontrato da Spaans et al. (2022).

Il sodio, cloro e potassio sono strettamente regolati essendo gli elettroliti principali dei fluidi corporei (Skrzypczak et al., 2014). Nel presente studio le concentrazioni di potassio non hanno subito modificazioni rilevanti; solamente nelle pluripare dei gruppi CMP e SMP è presente un aumento 7 giorni prima del parto, seguito da un abbassamento al parto. Ed inoltre, 7 giorni prima, al parto e 7 giorni dopo le concentrazioni in questi gruppi sono maggiori rispetto al gruppo di controllo. A 14 giorni dal parto il gruppo di controllo ha mostrato un innalzamento delle concentrazioni, riavvicinandosi ai valori degli altri gruppi. In tutti i gruppi, più ci si allontana dal parto,

più i valori di potassio sono tendenzialmente aumentati. L'abbassamento al parto è coerente con quanto osservato da Kurek and Stec (2005) e Özgo et al. (2008), che hanno rispettivamente osservato il valore di potassio più basso al parto e 1 giorno dopo.

Le concentrazioni di sodio tendono ad essere maggiori rispetto al restante periodo a 7 giorni prima e il giorno del parto; ciò che si può osservare inoltre sono le concentrazioni maggiori dei gruppi trattati rispetto al gruppo di controllo. A 7 giorni dal parto è osservabile una diminuzione in tendenzialmente in tutti i gruppi, maggiore per il gruppo di controllo. Il trend osservato nel presente studio è in accordo con quello osservato da Skrzypczak et al. (2014) e Spaans et al. (2022); il picco osservato è spiegabile dall'incremento dell'attività del sistema renina-angiotensina aldosterone che stimolando il riassorbimento renale di sodio, ne aumenta la concentrazione plasmatica. Il picco al parto è stato inoltre associato ad un aumento di vasopressina e ossitocina, coinvolte nella regolazione della pressione osmotica (Skrzypczak et al., 2014). Zhang et al. (2011) non hanno rilevato differenze nelle concentrazioni minerali (Na, K, Mg e ferro) tra bovine in chetosi subclinica e sane; inoltre non risultano presenti precedenti studi sul collegamento tra i principi attivi utilizzati in questo studio e il profilo minerale. Tuttavia la presenza di concentrazioni maggiori potrebbe essere indicativa di una certa influenza del trattamento.

Infine, le concentrazioni di cloro aumentano 7 giorni prima per i gruppi CMP e SMP, in particolare nelle pluripare. Questo aumento è continuo al parto per il gruppo CMP; invece c'è una diminuzione per il gruppo di controllo e SMP. A 7 giorni dal parto tutti i gruppi hanno presentato una diminuzione. Il gruppo SMP è stato quello con la concentrazione maggiore a 7 giorni prima del parto, il CMP quello al parto. L'incremento è coerente con quello osservato da (Skrzypczak et al., 2014; Spaans et al., 2022) ed è simile a quanto avvenuto per il sodio nel presente studio.

## 5.5. Parametri e rilievi clinici

Attraverso i parametri produttivi e i rilievi clinici è stato possibile osservare una maggiore efficacia del protocollo nel gruppo CMP: è evidente una maggiore produzione di colostro, probabilmente dovuto al migliore bilancio energetico presente in questo gruppo; risulta maggiore anche l'indice BRIX. Una maggiore produzione di colostro è definita come un fattore di rischio per lo sviluppo di chetosi (Vanholder et al., 2015); ciononostante nel nostro studio l'incidenza di chetosi si è dimostrata più bassa nel gruppo con 4 litri medi di colostro prodotto, probabilmente per l'effetto protettivo fornito dal trattamento con somministrazioni più frequenti. Lo stesso effetto non si è invece presentato in egual modo per SMP poiché questo gruppo ha presentato un'incidenza di

chetosi molto simile a quella del gruppo di controllo. Anche per altre patologie post parto il trattamento è risultato in una diminuzione, come per la ritenzione placentare, la mastite e la metrite; in particolare per la ritenzione placentare e laminita il protocollo migliore è stato quello semplificato, mentre per le restanti quello completo. Le patologie sopracitate sono fra loro correlate (Block, 2010), pertanto questi risultati supportano l'ipotesi un trattamento preventivo per la chetosi possa portare beneficio non solo per questa patologia ma anche per altre patologie presenti nel periodo di transizione.



## 6. CONCLUSIONI

Il presente studio ha rilevato un miglioramento di alcuni parametri, piuttosto che altri. I protocolli preventivi hanno portato ad un miglioramento senza distinzione di: glucosio, NEFA e BHB. Non ci sono state differenze significative per trigliceridi e colesterolo totale, mentre per i fosfolipidi, le concentrazioni sono state migliori nel gruppo CMP.

Tra gli enzimi del profilo epatico, entrambi i protocolli senza distinzione, hanno ridotto il danneggiamento epatico, visibile dalle concentrazioni di AST. Nel caso di GGT, sussiste una maggiore efficacia del protocollo completo. Il trattamento semplificato ha rilevato una maggiore efficacia nel mantenere più basse le concentrazioni di LDH. Infine, la bilirubina non ha presentato variazioni.

Tra i parametri del metabolismo proteico per l'albumina il miglior trattamento fino a 7 giorni post-parto è stato il completo, mentre successivamente il semplificato; l'urea ha presentato concentrazioni migliori con il protocollo semplificato. Per CPK l'efficienza è stata visibile solo quando le concentrazioni sono state molto elevate, senza differenza tra protocolli; infine, la creatinina ha presentato le concentrazioni medie più basse nel gruppo CMP.

Nel profilo minerale i protocolli hanno avuto un effetto positivo su ALP senza distinzioni; il calcio nel gruppo CMP ha avuto le concentrazioni più elevate, viceversa il magnesio quelle più basse; questi risultati sono migliori in quanto l'ipocalcemia è una patologia in stretta connessione con la chetosi. Il potassio, come anche il sodio e il cloro, con un trend simile, hanno avuto concentrazioni più alte nei gruppi trattati, senza distinzioni.

Infine, il gruppo CMP ha presentato la quantità media maggiore di colostro prodotto, il miglior indice BRIX, l'incidenza di chetosi, mastite e metrite acuta più bassa; il gruppo SMP ha presentato l'incidenza minore per la ritenzione placentare e la laminite. Data la correlazione tra le patologie presenti in fase di transizione, la gestione in prevenzione della chetosi può essere efficace anche per altre patologie.

È possibile dunque affermare l'efficacia di entrambi i protocolli preventivi utilizzati, però, siccome i parametri migliorati in CMP sono maggiori rispetto che in SMP e l'incidenza di chetosi risulta minore a livello clinico, il protocollo preventivo completo risulta migliore nella gestione della chetosi.

È quindi necessario eseguire ulteriori studi, anche su un numero più elevato di campioni, per poter valutare l'utilizzo di un protocollo preventivo semplificato; questo aiuterebbe l'allevatore e il medico veterinario nella gestione della chetosi e delle altre patologie del periodo di transizione, migliorando così la salute dell'animale e le performance produttive e riproduttive.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Ametaj B.N., Zebeli Q., Iqbal S., and Dunn S.M. (2012). Meeting the challenges of improving health in periparturient dairy cows. *Advanced Dairy Technologies*, 24:287–317.
2. Andrews T. (1998). Ketosis and fatty liver in cattle. *In Practice*, 20(9):509–513.
3. Ardalan M., Rezayazdi K., and Dehghan-Banadaky M. (2010). Effect of rumen-protected choline and methionine on physiological and metabolic disorders and reproductive indices of dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(6):259–265.
4. Arfuso F., Fazio F., Levanti M., Rizzo M., Pietro S. Di, Giudice E., and Piccione G. (2016). Lipid and lipoprotein profile changes in dairy cows in response to late pregnancy and the early postpartum period. *Archives Animal Breeding*, 59(4):429–434.
5. Attupuram N.M., Kumaresan A., Narayanan K., and Kumar H. (2016). Cellular and molecular mechanisms involved in placental separation in the bovine: A review. *Molecular Reproduction and Development*, 83(4):287–297.
6. Baird D.G. (1982). Primary Ketosis in the High-Producing Dairy Cow: Clinical and Subclinical Disorders, Treatment, Prevention, and Outlook. *Journal of Dairy Science*, 65(1):1–10.
7. Banzato T., Fiore E., Morgante M., Manuali E., and Zotti A. (2016). Texture analysis of B-mode ultrasound images to stage hepatic lipidosis in the dairy cow: A methodological study. *Research in Veterinary Science*, 108:71–75.
8. Basoglu A., Baspinar N., Tenori L., Licari C., and Gulersoy E. (2020). Nuclear magnetic resonance (NMR)-based metabolome profile evaluation in dairy cows with and without displaced abomasum. *Veterinary Quarterly*, 40(1):1–15.
9. Bauman D.E., and Currie B.W. (1980). Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of dairy science*, 63(9):1514–1529.
10. Baumgard L.H., Odens L.J., Kay J.K., Rhoads R.P., Vanbaale M.J., and Collier R.J. (2006). Does negative energy balance (NEBAL) limit milk synthesis in early lactation. *In proc. 21st Annual Southwest Nutrition & Management*, :181–187.
11. Beagley J.C., Whitman K.J., Baptiste K.E., and Scherzer J. (2010). Physiology and Treatment of Retained Fetal Membranes in Cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(2):261–268.
12. Bell A.W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*, 73(9):2804–2819.

13. Bionaz M., Trevisi E., Calamari L., Librandi F., Ferrari A., and Bertoni G. (2007). Plasma Paraoxonase, Health, Inflammatory Conditions, and Liver Function in Transition Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 90(4):1740–1750.
14. Block E. (2010). Transition Cow Research – What Makes Sense Today?, 75–98.
15. Bobe G., Young J.W., and Beitz D.C. (2004). Invited Review: Pathology, Etiology, Prevention, and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 87(10):3105–3124.
16. Bossaert P., Leroy J.L.M.R., de Campeneere S., de Vliegher S., and Opsomer G. (2009). Differences in the glucose-induced insulin response and the peripheral insulin responsiveness between neonatal calves of the Belgian Blue, Holstein-Friesian, and east Flemish breeds. *Journal of Dairy Science*, 92(9):4404–4411.
17. Bourne N., Laven R., Wathes D.C., Martinez T., and McGowan M. (2007). A meta-analysis of the effects of Vitamin E supplementation on the incidence of retained foetal membranes in dairy cows. *Theriogenology*, 67(3):494–501.
18. Bronner F., and Pansu D. (1999). Nutritional aspects of calcium absorption. *The Journal of nutrition*, 129(1):9–12.
19. Brunner N., Groeger S., Canelas Raposo J., Bruckmaier R.M., and Gross J.J. (2019). Prevalence of subclinical ketosis and production diseases in dairy cows in Central and South America, Africa, Asia, Australia, New Zealand, and Eastern Europe. *Translational Animal Science*, 3(1):84–92.
20. Bruun J., Ersboll A.K., and Alban L. (2002). Risk factors for metritis in Danish dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 54(2):179–190.
21. Burton A.J., Nydam D. V., Ollivett T.L., and 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 the American Veterinary Medical Association*, 234(9):1177–1182.
22. Bustamante J., Lodge J.K., Marcocci L., Tritschler H.J., Packer L., and Rihn B.H. (1998).  $\alpha$ -Lipoic Acid in Liver Metabolism and Disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(6):1023–1039.
23. Cainzos J.M., Andreu-Vazquez C., Guadagnini M., Rijpert-Duvivier A., and Duffield T. (2022). A systematic review of the cost of ketosis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 105(7):6175–6195.
24. Chandler P.T., and Cragle R.G. (1962). Gastrointestinal sites of absorption and endogenous secretion of calcium and phosphorus in dairy calves. *Proceedings of the Society for*

- Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), 111(2):431–434.
25. Chapinal N., LeBlanc S.J., Carson M.E., Leslie K.E., Godden S., Capel M., Santos J.E.P., Overton M.W., and Duffield T.F. (2012). Herd-level association of serum metabolites in the transition period with disease, milk production, and early lactation reproductive performance. *Journal of Dairy Science*, 95(10):5676–5682.
  26. Chiba A., Onomi R., Hatate K., Moriyama T., Goto A., and Yamagishi N. (2020). Peripartum changes in serum activities of three major alkaline phosphatase isoenzymes in Holstein dairy cows. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 23(3):457–459.
  27. Coleman D.N., Vailati-Riboni M., Elolimy A.A., Cardoso F.C., Rodriguez-Zas S.L., Miura M., Pan Y.X., and Looor J.J. (2019). Hepatic betaine-homocysteine methyltransferase and methionine synthase activity and intermediates of the methionine cycle are altered by choline supply during negative energy balance in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 102(9):8305–8318.
  28. Constable P.D., Hinchcliff K.W., Done S.H., and Gruenberg W. (2017). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats - Two-Volume Set*. 11th Edition.
  29. Coppock C.E. (1974). Displaced Abomasum in Dairy Cattle: Etiological Factors. *Journal of Dairy Science*, 57(8):926–933.
  30. Coppock C.E. (1985). Energy Nutrition and Metabolism of the Lactating Dairy Cow. *Journal of Dairy Science*, 68(12):3403–3410.
  31. Correa M.T., Erb H.N., and Scarlett J.M. (1993). Risk Factors for Downer Cow Syndrome. *Journal of Dairy Science*, 76(11):3460–3463.
  32. NRC. (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition, 2001*. 7th edition. National Academies Press, Washington, DC.
  33. Cox V.S. (1988). Nonsystemic Causes of the Downer Cow Syndrome. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 4(2):413–433.
  34. Cox V.S., Marsh W.E., Steuernagel G.R., Fletcher T.F., and Onapito J.S. (1986). Downer cow occurrence in Minnesota dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 4(3):249–260.
  35. Cox V.S., and Onapito D.V.M.J.S. (1986). An Update on the downer cow syndrome. *The Bovine Practitioner*, 21:195–199.
  36. Croze M.L., and Soulage C.O. (2013). Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. *Biochimie*, 95(10):1811–1827.

37. Dahlberg J. (2012). Flotation therapy for downer cows. Examensarbete inom veterinärprogrammet, 28.
38. Dawson L.J., Aalseth E.P., Rice L.E., and Adams G.D. (1992). Influence of fiber form in a complete mixed ration on incidence of left displaced abomasum in postpartum dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 200(12):1989–1992.
39. DeGaris P.J., and Lean I.J. (2008). Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles. *The Veterinary Journal*, 176(1):58–69.
40. Đoković R., Ilić Z., Kurćubić V., Petrović M., Cincović M., Petrović M.P., and Caro P.V. (2019). Diagnosis of subclinical ketosis in dairy cows. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 35(2):111–125.
41. Doll K., Sickinger M., and Seeger T. (2009). New aspects in the pathogenesis of abomasal displacement. *The Veterinary Journal*, 181(2):90–96.
42. Drackley J.K. (1999). Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? *Journal of Dairy Science*, 82(11):2259–2273.
43. Drackley J.K., Dann H.M., Douglas G.N., Janovick Guretzky N.A., Litherland N.B., Underwood J.P., and Looor J.J. (2005). Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Italian Journal of Animal Science*, 4(4):323–344.
44. Van Der Drift S.G.A., Houweling M., Bouman M., Koets A.P., Tielens A.G.M., Nielen M., and Jorritsma R. (2015). Effects of a single glucocorticoid injection on propylene glycol-treated cows with clinical ketosis. *The Veterinary Journal*, 204(2):144–149.
45. Drillich M., Mahlstedt M., Reichert U., Tenhagen B.A., and Heuwieser W. (2006). Strategies to Improve the Therapy of Retained Fetal Membranes in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 89(2):627–635.
46. Duffield T.F., Leslie K.E., Sandals D., Lissemore K., McBride B.W., Lumsden J.H., Dick P., and Bagg R. (1999). Effect of a Monensin-Controlled Release Capsule on Cow Health and Reproductive Performance. *Journal of Dairy Science*, 82(11):2377–2384.
47. Duffield T.F., Lissemore K.D., McBride B.W., and Leslie K.E. (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of dairy science*, 92(2):571–580.
48. Duffield T.F., Sandals D., Leslie K.E., Lissemore K., McBride B.W., Lumsden J.H., Dick P., and Bagg R. (1998). Efficacy of Monensin for the Prevention of Subclinical Ketosis in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 81(11):2866–2873.

49. Engelking L.R. (2015). Textbook of Veterinary Physiological Chemistry. 3rd Edition. Elsevier.
50. Esposito G., Irons P.C., Webb E.C., and Chapwanya A. (2014). Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 144(3–4):60–71.
51. Farag E.A.R., and Metwally A.M.M. (2012). Markers Used for Prediction of Ketosis and Milk Fever in Dairy Buffaloes at Kaliobeia Governorate. *Global Veterinaria*, 9(1):1–07.
52. Feldman D., Pike J.W., and Adams J. (2011). Vitamin D: Two-Volume Set. Elsevier.
53. Fiore E., Gianesella M., Arfuso F., Giudice E., Piccione G., Lora M., Stefani A., and Morgante M. (2014). Glucose infusion response on some metabolic parameters in dairy cows during transition period. *Archives Animal Breeding*, 57(1):1–9.
54. Fiore E., Perillo L., Gianesella M., Giannetto C., Giudice E., Piccione G., and Morgante M. (2021). Comparison between two preventive treatments for hyperketonaemia carried out pre-partum: effects on non-esterified fatty acids,  $\beta$ -hydroxybutyrate and some biochemical parameters during peripartum and early lactation. *Journal of Dairy Research*, 88(1):38–44.
55. Fiore E., Perillo L., Piccione G., Gianesella M., Bedin S., Armato L., Giudice E., and Morgante M. (2016). Effect of combined acetylmethionine, cyanocobalamin and  $\alpha$ -lipoic acid on hepatic metabolism in high-yielding dairy cow. *Journal of Dairy Research*, 83(4):438–441.
56. Geishauser T., Leslie K., Kelton D., and Duffield T. (2001). Monitoring for Subclinical Ketosis in Dairy Herds. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian - North American Edition*, 23(8):S65–S71.
57. Gianesella M., Perillo L., Fiore E., Giudice E., Zumbo A., Morgante M., and Piccione G. (2018). Transition period in healthy and diseased dairy cows: evaluation of metabolic modifications. *Large Animal Review*, 24(3):107–111.
58. Gilbert R., Santos Ribeiro N., Galvao K.N., Brittin S.B., and Roman H.A. (2007). The relationship between postpartum uterine bacterial infection (bi) and subclinical endometritis (se). *Journal of Dairy Science*, 90(1):469–470.
59. Gillund P., Reksen O., Gröhn Y.T., and Karlberg K. (2001). Body Condition Related to Ketosis and Reproductive Performance in Norwegian Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 84(6):1390–1396.
60. Gitto E., Reiter R.J., Karbownik M., Tan D.X., Gitto P., Barberi S., and Barberi I. (2002). Causes of Oxidative Stress in the Pre- and Perinatal Period. *Biology of the Neonate*, 81(3):146–157.

61. Giuliadori M.J., Magnasco R.P., Becu-Villalobos D., Lacau-Mengido I.M., Risco C.A., and De la Sota R.L. (2013). Metritis in dairy cows: Risk factors and reproductive performance. *Journal of Dairy Science*, 96(6):3621–3631.
62. Goff J.P. (2000). Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 16(2):319–337.
63. Goff J.P. (2004). Macromineral disorders of the transition cow. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20(3):471–494.
64. Goff J.P. (2008). The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176(1):50–57.
65. Goff J.P. (2014). Calcium and Magnesium Disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 30(2):359–381.
66. Goff J.P., and Horst R.L. (1997). Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders. *Journal of Dairy Science*, 80(7):1260–1268.
67. Goff J.P., Reinhardt T.A., and Horst R.L. (1995). Milk Fever and Dietary Cation-Anion Balance Effects on Concentration of Vitamin D Receptor in Tissue of Periparturient Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 78(11):2388–2394.
68. Gohary K., Overton M.W., Von Massow M., LeBlanc S.J., Lissemore K.D., and Duffield T.F. (2016). The cost of a case of subclinical ketosis in Canadian dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal*, 57(7):728.
69. Gorąca A., Huk-Kolega H., Piechota A., Kleniewska P., Ciejka E., and Skibska B. (2011). Lipoic acid - Biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Reports*, 63(4):849–858.
70. Gordon J.L., LeBlanc S.J., and Duffield T.F. (2013). Ketosis treatment in lactating dairy cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 29(2):433–445.
71. Grant R.J., and Albright J.L. (1995). Feeding behavior and management factors during the transition period in dairy cattle. *Journal of Animal Science*, 73(9):2791–2803.
72. Graulet B., Matte J.J., Desrochers A., Doepel L., Palin M.F., and Girard C.L. (2007). Effects of Dietary Supplements of Folic Acid and Vitamin B12 on Metabolism of Dairy Cows in Early Lactation. *Journal of Dairy Science*, 90(7):3442–3455.
73. Gröhn Y.T., Erb H.N., McCulloch C.E., and Saloniemi H.S. (1989). Epidemiology of Metabolic Disorders in Dairy Cattle: Association Among Host Characteristics, Disease, and Production. *Journal of Dairy Science*, 72(7):1876–1885.

74. Gruffat D., Durand D., Graulet B., and Bauchart D. (1996). Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. *Reproduction, nutrition, development*, 36(4):375–389.
75. Grummer R.R. (1993). Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *Journal of dairy science*, 76(12):3882–3896.
76. Grummer R.R., Mashek D.G., and Hayirli A. (2004). Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 20(3):447–470.
77. Ha S., Kang S., Han M., Lee J., Chung H., Oh S.I., Kim S., and Park J. (2022). Predicting ketosis during the transition period in Holstein Friesian cows using hematological and serum biochemical parameters on the calving date. *Scientific Reports*, 12(1):1–9.
78. Hailemariam D., Mandal R., Saleem F., Dunn S.M., Wishart D.S., and Ametaj B.N. (2014). Identification of predictive biomarkers of disease state in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(5):2680–2693.
79. Han Y.K., and Kim I.H. (2005). Risk factors for retained placenta and the effect of retained placenta on the occurrence of postpartum diseases and subsequent reproductive performance in dairy cows. *Journal of Veterinary Science*, (6):53–59.
80. Hayirli A. (2006). The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Veterinary Research Communications*, 30(7):749–774.
81. Hayirli A., and Grummer R.R. (2004). Factors affecting dry matter intake prepartum in relationship to etiology of peripartum lipid-related metabolic disorders: A review. *Canadian Journal of Animal Science*, 84(3):337–347.
82. Hayirli A., Grummer R.R., Nordheim E. V., and Crump P.M. (2002). Animal and Dietary Factors Affecting Feed Intake During the Prefresh Transition Period in Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 85(12):3430–3443.
83. Herdt T.H. (2000). Ruminant Adaptation to Negative Energy Balance: Influences on the Etiology of Ketosis and Fatty Liver. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(2):215–230.
84. Herdt T.H., and Emery R.S. (1992). Therapy of Diseases of Ruminant Intermediary Metabolism. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 8(1):91–106.
85. Hoeben D., Monfardini E., Opsomer G., Burvenich C., Dosogne H., De Kruif A., and Beckers J.F. (2000). Chemiluminescence of bovine polymorphonuclear leucocytes during the periparturient



- period and relation with metabolic markers and bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Journal of Dairy Research*, 67(2):249–259.
86. Horst R.L. (1986). Regulation of Calcium and Phosphorus Homeostasis in the Dairy Cow. *Journal of Dairy Science*, 69(2):604–616.
87. Horst R.L., Goff J.P., and Reinhardt T.A. (1994). Calcium and Vitamin D Metabolism in the Dairy Cow. *Journal of Dairy Science*, 77(7):1936–1951.
88. Hossein-Zadeh N.G., and Ardalan M. (2011). Cow-specific risk factors for retained placenta, metritis and clinical mastitis in Holstein cows. *Veterinary Research Communications*, 35(6):345–354.
89. Huime R.B.M., Dijkhuizen A.AP., Van Beek P., and Renkema J.A. (1997). *Animal Health Economics: Principles and Applications*. A. A. Dijkhuizen and R. S. Morris, ed. University of Sydney.
90. Ibrahim N., and Kirmani A. (2021). Milk Fever in Dairy Cows: A Systematic Review. *Research Journal of Biology*,.
91. 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(7):1573–1597.
92. Jorgensen N.A. (1974). Combating Milk Fever,. *Journal of Dairy Science*, 57(8):933–944.
93. Jorritsma R., Wensing T., Kruip T., Vos P., and Noordhuizen J. (2003). Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Veterinary Research*, 34(1):11–26.
94. Jouany J.P. (2006). Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. *Animal Reproduction Science*, 96(3–4):250–264.
95. Kahn R.C. (1978). Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: A necessary distinction. *Metabolism*, 27(12):1893–1902.
96. Kauppinen K. (1983). Prevalence of bovine ketosis in relation to number and stage of lactation. *Acta veterinaria Scandinavica*, 24(4):349–361.
97. Kennedy D.G., Cannavan A., Molloy A., harte F.O., Taylor S.M., Kennedy S., and Blanchflower W.J. (1990). Methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) and methionine synthetase (EC 2.1.1.13) in the tissues of cobalt–vitamin B12 deficient sheep. *British Journal of Nutrition*, 64(3):721–732.

98. Kim J.W. (2014). Modulation of the Somatotropic Axis in Periparturient Dairy Cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(1):147.
99. Klein R., Nagy O., Tóthová C., and Chovanová F. (2020). Clinical and Diagnostic Significance of Lactate Dehydrogenase and Its Isoenzymes in Animals. *Veterinary medicine international*, 2020.
100. Komatsu T., Itoh F., Kushibiki S., and Hodate K. (2005). Changes in gene expression of glucose transporters in lactating and nonlactating cows. *Journal of Animal Science*, 83(3):557–564.
101. De Koster J.D., and Opsomer G. (2013). Insulin Resistance in Dairy Cows. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 29(2):299–322.
102. Kuhla B., Nürnberg G., Albrecht D., Görs S., Hammon H.M., and Metges C.C. (2011). Involvement of skeletal muscle protein, glycogen, and fat metabolism in the adaptation on early lactation of dairy cows. *Journal of Proteome Research*, 10(9):4252–4262.
103. Kurek Ł., and Stec A. (2005). The influence of the perinatal period and age on the levels of selected macroelements, indicators of parenchyma organs and level of free fatty acids in healthy dairy cows. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska*, 60:37–54.
104. Lacetera N., Scalia D., Bernabucci U., Ronchi B., Pirazzi D., and Nardone A. (2005). Lymphocyte Functions in Overconditioned Cows Around Parturition. *Journal of Dairy Science*, 88(6):2010–2016.
105. Lacetera N., Scalia D., Franci O., Bernabucci U., Ronchi B., and Nardone A. (2004). Short Communication: Effects of Nonesterified Fatty Acids on Lymphocyte Function in Dairy Heifers. *Journal of Dairy Science*, 87(4):1012–1014.
106. Lean I.J., DeGaris P.J., McNeil D.M., and Block E. (2006). Hypocalcemia in Dairy Cows: Meta-analysis and Dietary Cation Anion Difference Theory Revisited. *Journal of Dairy Science*, 89(2):669–684.
107. Leblanc S. (2010). Monitoring Metabolic Health of Dairy Cattle in the Transition Period. *Journal of Reproduction and Development*, 56(S):S29–S35.
108. Leduc L., Arango-Sabogal J.C., Francoz D., Nichols S., Desrochers A., Schelcher F., and Fecteau G. (2023). Presence or severity of hypophosphatemia is not associated with survival outcome in postpartum downer dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 261(6):852–857.
109. Li Y., Ding H.Y., Wang X.C., Feng S.B., Li X.B., Wang Z., Liu G.W., and Li X.W. (2016). An association between the level of oxidative stress and the concentrations of NEFA and BHBA in

- the plasma of ketotic dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(5):844–851.
110. Li Y., Xu C., Xia C., Zhang H., Sun L., and Gao Y. (2014). Plasma metabolic profiling of dairy cows affected with clinical ketosis using LC/MS technology. *Veterinary Quarterly*, 34(3):152–158.
  111. Liang D., Arnold L.M., Stowe C.J., Harmon R.J., and Bewley J.M. (2017). Estimating US dairy clinical disease costs with a stochastic simulation model. *Journal of Dairy Science*, 100(2):1472–1486.
  112. Lucy M.C., Green J.C., Meyer J.P., Williams A.M., Newsom E.M., and Keisler D.H. (2012). Short communication: Glucose and fructose concentrations and expression of glucose transporters in 4- to 6-week pregnancies collected from Holstein cows that were either lactating or not lactating. *Journal of Dairy Science*, 95(9):5095–5101.
  113. Mahen P.J., Williams H.J., Smith R.F., and Grove-White D. (2018). Effect of blood ionised calcium concentration at calving on fertility outcomes in dairy cattle. *Veterinary Record*, 183(8):263–263.
  114. Marczuk J., Brodzki P., Brodzki A., and Kurek. (2018). The concentration of free amino acids in blood serum of dairy cows with primary ketosis. *Polish journal of veterinary sciences*, 21(1):149–156.
  115. Martens H. (2020). Transition Period of the Dairy Cow Revisited: I. Homeorhesis and Its Changes by Selection and Management. *Journal of Agricultural Science*, 12(3):1–24.
  116. Martín-Tereso J., and Verstegen M.W.A. (2011). A novel model to explain dietary factors affecting hypocalcaemia in dairy cattle. *Nutrition Research Reviews*, 24(2):228–243.
  117. McArt J.A.A., Nydam D. V., and Oetzel G.R. (2012). A field trial on the effect of propylene glycol on displaced abomasum, removal from herd, and reproduction in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science*, 95(5):2505–2512.
  118. McArt J.A.A., Nydam D. V., Ospina P.A., and Oetzel G.R. (2011). A field trial on the effect of propylene glycol on milk yield and resolution of ketosis in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science*, 94(12):6011–6020.
  119. McArt J.A.A., Nydam D. V., and Overton M.W. (2015). Hyperketonemia in early lactation dairy cattle: A deterministic estimate of component and total cost per case. *Journal of Dairy Science*, 98(3):2043–2054.

120. McArt J.A.A., and Oetzel G.R. (2023). Considerations in the Diagnosis and Treatment of Early Lactation Calcium Disturbances. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 39(2):241–259.
121. Ménard L., and Thompson A. (2007). Milk fever and alert downer cows: Does hypophosphatemia affect the treatment response? *The Canadian Veterinary Journal*, 48(5):487.
122. Mohamed G.A.E. (2014). Investigation of some enzymes level in blood and milk serum in two stages of milk yield dairy cows at Assiut city. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 60(142):110–120.
123. Morrow et al. (1979). Clinical investigation of a dairy herd with the fat cow syndrome. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 174:161–167.
124. Van Mosel M., Van 't Klooster A.T., Van Mosel F., and Van Der Kuilen J. (1993). Effects of reducing dietary [(Na+ + K+) – (Cl- + SO4=)] on the rate of calcium mobilisation by dairy cows at parturition. *Research in Veterinary Science*, 54(1):1–9.
125. Mostafavi M., Seifi H., Mohri M., and Jamshidi A. (2013). Optimal thresholds of metabolic indicators of hepatic lipidosis in dairy cows. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 164(12):564–571.
126. Ospina P.A., Nydam D. V., Stokol T., and Overton T.R. (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.
127. Ożgo M., Skrzypczak W.F., Michałek K., Lepczyński A., Herosimczyk A., and Dratwa A. (2008). Regulacja gospodarki wodno-elektrolitowej matki i noworodka Noworodek a środowisko. Monografia "Noworodek a środowisko," :151–180.
128. Palmquist D.L. (1976). A Kinetic Concept of Lipid Transport in Ruminants. A Review. *Journal of Dairy Science*, 59(3):355–363.
129. Park K.G., Min A.K., Koh E.H., Kim H.S., Kim M.O., Park H.S., Kim Y.D., Yoo T.S., Jang B.K., Hwang J.S., Kim J.B., Choi H.S., Park J.Y., Lee I.K., and Lee K.U. (2008). Alpha-lipoic acid decreases hepatic lipogenesis through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent pathways. *Hepatology*, 48(5):1477–1486.
130. Pavlata L., Pechová A., and Illek J. (2001). Muscular dystrophy in dairy cows following a change in housing technology. *Acta Veterinaria Brno*, 70(3):269–275.
131. Piantoni P., and Allen M.S. (2015). Evaluation of propylene glycol and glycerol infusions as treatments for ketosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(8):5429–5439.

132. Piccione G., Messina V., Schembari A., Casella S., Giannetto C., and Alberghina D. (2011). Pattern of serum protein fractions in dairy cows during different stages of gestation and lactation. *The Journal of dairy research*, 78(4):421–425.
133. Pinotti L., Baldi A., and Dell’Orto V. (2002). Comparative mammalian choline metabolism with emphasis on the high-yielding dairy cow. *Nutrition Research Reviews*, 15(2):315–332.
134. Pires J. A.A., Souza A. H., and Grummer R. R. (2007). Induction of Hyperlipidemia by Intravenous Infusion of Tallow Emulsion Causes Insulin Resistance in Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 90(6):2735–2744.
135. Pires J.A.A., Delavaud C., Faulconnier Y., Pomiès D., and Chilliard Y. (2013). Effects of body condition score at calving on indicators of fat and protein mobilization of periparturient Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 96(10):6423–6439.
136. Reece W.O. (2015). *Dukes’ Physiology of Domestic Animals*, 13th Edition. W.O. Reece, H.H. Erickson, J.P. Goff, and E.E. Uemura, ed. Wiley Blackwell.
137. Reinhardt T.A., Lippolis J.D., McCluskey B.J., Goff J.P., and Horst R.L. (2011). Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *The Veterinary Journal*, 188(1):122–124.
138. Ritchie R.F., Palomaki G.E., Neveux L.M., Navolotskaia O., Ledue T.B., and Craig W.Y. (1999). Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin, transferrin and transthyretin: A practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 13(6):273–279.
139. Robertson JM. (1966). The evaluation of a therapeutic trial on bovine ketosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 149:1620–1623.
140. Roche J.R., Macdonald K.A., Schütz K.E., Matthews L.R., Verkerk G.A., Meier S., Looor J.J., Rogers A.R., McGowan J., Morgan S.R., Taukiri S., and Webster J.R. (2013). Calving body condition score affects indicators of health in grazing dairy cows. *Journal of dairy science*, 96(9):5811–5825.
141. Rollin E., Berghaus R.D., Rapnicki P., Godden S.M., and Overton M.W. (2010). The effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum  $\beta$ -hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 93(3):978–987.
142. Ronge H., Blum J., Clement C., Jans F., Leuenberger H., and Binder H. (1988). Somatomedin C in dairy cows related to energy and protein supply and to milk production. *Animal Production*, 47:165–183.

143. Rukkwamsuk T., Wensing T., and Geelen M.J.H. (1999). Effect of Fatty Liver on Hepatic Gluconeogenesis in Periparturient Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 82(3):500–505.
144. Russell K.E., and Rousel A.J. (2007). Evaluation of the Ruminant Serum Chemistry Profile. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 23(3):403–426.
145. Saborío-Montero A., Vargas-Leitón B., Romero-Zúñiga J.J., and Sánchez J.M. (2017). Risk factors associated with milk fever occurrence in grazing dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 100(12):9715–9722.
146. Sakai T., Havakawa T., Hamakawa M., Ogura K., and Kubol S. (1993). Therapeutic Effects of Simultaneous Use of Glucose and Insulin in Ketotic Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 76(1):109–114.
147. Sato R., Onda K., Kato H., Ochiai H., Kawai K., Iriki T., Kaneko K., Yamazaki Y., and Wada Y. (2013). An evaluation of the effect of age and the peri-parturient period on bone metabolism in dairy cows as measured by serum bone-specific alkaline phosphatase activity and urinary deoxypyridinoline concentration. *The Veterinary Journal*, 197(2):358–362.
148. Sattler N., and Fecteau G. (2014). Hypokalemia Syndrome in Cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 30(2):351–357.
149. Scott P.R., Penny C.D., and Macrae A.I. (2011). *Cattle Medicine*. 1st Edition. Manson Publishing.
150. Shaver R.D. (1997). Nutritional Risk Factors in the Etiology of Left Displaced Abomasum in Dairy Cows: A Review. *Journal of Dairy Science*, 80(10):2449–2453.
151. Sheldon I.M., Lewis G.S., LeBlanc S., and Gilbert R.O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65(8):1516–1530.
152. Skrzypczak W., Kurpińska A., Stański Ł., and Jarosz A. (2014). Sodium, potassium and chloride homeostasis in cows during pregnancy and first months of lactation. *Acta Biologica Cracoviensia Series Zoologia*, 55:58–64.
153. Smith B., Van Metre D., and Pusterla N. (2019). *Large Animal Internal Medicine*. Elsevier.
154. Song Y., Li N., Gu J., Fu S., Peng Z., Zhao C., Zhang Y., Li X., Wang Z., Li X., and Liu G. (2016).  $\beta$ -Hydroxybutyrate induces bovine hepatocyte apoptosis via an ROS-p38 signaling pathway. *Journal of Dairy Science*, 99(11):9184–9198.
155. Sordillo L.M., and Raphael W. (2013). Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 29(2):267–278.

156. Spaans O.K., Kuhn-Sherlock B., Hickey A., Crookenden M.A., Heiser A., Burke C.R., Phyn C.V.C., and Roche J.R. (2022). Temporal profiles describing markers of inflammation and metabolism during the transition period of pasture-based, seasonal-calving dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 105(3):2669–2698.
157. Sun F., Cao Y., Cai C., Li S., Yu C., and Yao J. (2016). Regulation of Nutritional Metabolism in Transition Dairy Cows: Energy Homeostasis and Health in Response to Post-Ruminal Choline and Methionine. *PLoS One*, 11(8).
158. Sun L.W., Zhang H.Y., Wu L., Shu S., Xia C., Xu C., and Zheng J.S. (2014). <sup>1</sup>H-Nuclear magnetic resonance-based plasma metabolic profiling of dairy cows with clinical and subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science*, 97(3):1552–1562.
159. Suriyasathaporn W., Heuer C., Noordhuizen-Stassen E.N., and Schukken Y.H. (2000). Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. *Veterinary Research*, 31(4):397–412.
160. Tao S., and Dahl G.E. (2013). Invited review: Heat stress effects during late gestation on dry cows and their calves. *Journal of Dairy Science*, 96(7):4079–4093.
161. Teitelbaum S.L. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5484):1504–1508.
162. Thilsing-Hansen T., Jørgensen R.J., and Østergaard S. (2002). Milk fever control principles: A review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43(1):1–19.
163. Val-Laillet D., Guesdon V., von Keyserlingk M.A.G., de Passillé A.M., and Rushen J. (2009). Allogrooming in cattle: Relationships between social preferences, feeding displacements and social dominance. *Applied Animal Behaviour Science*, 116(2–4):141–149.
164. Vanholder T., Papen J., Bemers R., Vertenten G., and Berge A.C.B. (2015). Risk factors for subclinical and clinical ketosis and association with production parameters in dairy cows in the Netherlands. *Journal of Dairy Science*, 98(2):880–888.
165. Veenhuizen J.J., Drackley J.K., Richard M.J., Sanderson T.P., Miller L.D., and Young J.W. (1991). Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows. *Journal of dairy science*, 74(12):4238–4253.
166. Venjakob P.L., Staufienbiel R., Heuwieser W., and Borchardt S. (2021). Association between serum calcium dynamics around parturition and common postpartum diseases in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 104(2):2243–2253.

167. Wathes D.C., Fenwick M., Cheng Z., Bourne N., Llewellyn S., Morris D.G., Kenny D., Murphy J., and Fitzpatrick R. (2007). Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology*, 68(S):S232–S241.
168. Weigand E., Young J.W., and McGilliard A.D. (1972). Extent of propionate metabolism during absorption from the bovine ruminoreticulum. *The Biochemical journal*, 126(1):201–209.
169. Wensing T., Kruip T., and Geelen M.J.H. (1997). Postpartum fatty liver in high-producing dairy cows in practice and in animal studies. The connection with health, production and reproduction problems. *Comparative Haematology International*, 7(3):167–171.
170. Zeisel S.H. (2013). Choline: an important nutrient in brain development, liver function and carcinogenesis. *Journal of the American College of Nutrition*, 11(5):473–481.
171. Zhang F., Nan X., Wang H., Zhao Y., Guo Y., and Xiong B. (2020). Effects of Propylene Glycol on Negative Energy Balance of Postpartum Dairy Cows. *Animals: an open access journal from MDPI*, 10(9):1–15.
172. Zhang Z., Li X., Wang H., Guo C., Gao L., Liu L., Gao R., Zhang Y., Li P., Wang Z., Li Y., and Liu G. (2011). Concentrations of sodium, potassium, magnesium, and iron in the serum of dairy cows with subclinical ketosis. *Biological Trace Element Research*, 144(1–3):525–528.
173. Zhao F.Q., and Keating A.F. (2007). Expression and Regulation of Glucose Transporters in the Bovine Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*, 90(S):E76–E86.
174. Zhou J., Zhang J., Tian W., and Zheng C. (1997). Study of the effect of fatty liver on fertility in periparturient cows. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 28:115–119.
175. Zwald N.R., Weigel K.A., Chang Y.M., Welper R.D., and Clay J.S. (2004). Genetic Selection for Health Traits Using Producer-Recorded Data. II. Genetic Correlations, Disease Probabilities, and Relationships with Existing Traits. *Journal of Dairy Science*, 87(12):4295–4302.