

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
**Dipartimento di Medicina animale, produzioni e
salute**

**Corso di laurea a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA**

**Efficacia di protocolli vaccinali atti a prevenire la
BRD nei vitelli da latte: valutazione mediante score
ecografici**

Relatore

Prof. Enrico Fiore

Correlatrice

Dott.ssa Anastasia Lisuzzo

Laureanda

Aurora Biasutto

Matricola n. 1191664

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

INDICE

Riassunto.....	1
Abstract.....	3
1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 La vitellaia nelle aziende di vacche da latte.....	5
1.1.1 Gestione dei vitelli e della vitellaia	6
1.1.2 Prevenzione delle principali problematiche sanitarie della vitellaia	8
1.2 Bovine Respiratory Disease Complex (BRDC).....	14
1.2.1 Agenti patogeni responsabili di BRD.....	14
1.2.2 Patogenesi della BRD.....	19
1.2.3 Sintomatologia clinica della BRD	22
1.2.4 Diagnosi di BRD	23
1.2.5 Prevenzione della BRD nella vitellaia.....	33
1.2.6 Importanza economica della BRD.....	36
1.3 Applicazione dell'ecografia alla diagnosi di patologie respiratorie.....	38
1.3.1 Vantaggi e svantaggi dell'ecografia	44
2. OBIETTIVI	47
3. MATERIALI E METODI.....	48
3.1 Valutazione clinica.....	50
3.2 Valutazione ecografica.....	52
3.3 Analisi statistica	56
4. RISULTATI.....	57
5. DISCUSSIONE.....	62
6. CONCLUSIONE.....	68
Bibliografia	69
Sitografia.....	79
Riferimenti normativi	79

RIASSUNTO

Il *Bovine Respiratory Disease Complex* (BRD) è una sindrome respiratoria a eziologia multifattoriale diffusa tra i vari settori dell'allevamento bovino, compreso il settore delle vacche da latte, ed è una delle principali cause di mortalità e mortalità tra i vitelli pre- e post-svezzamento, oltre a comportare importanti perdite economiche per l'allevatore. La prevenzione di questa patologia mediante diagnosi precoce e ideazione di buon piano profilattico è fondamentale. Gli obiettivi di questo studio stati studiare l'efficacia di diversi protocolli vaccinali nel controllo della BRD nella vitellaia, confrontando eventuali differenze tra le vie di somministrazione, e valutare l'ecografia toracica come metodo diagnostico e di *screening* in allevamento. Per lo studio sono stati reclutati 201 vitelli di razza Frisona divisi tra controllo (A) e gruppi sottoposti a vaccinazione intranasale (B), parenterale (C) ed entrambe (D). L'età degli animali a inizio prova era di 10 ± 2 giorni per i gruppi A, B e C e 15 ± 2 giorni d'età per il gruppo D. Per definire l'efficacia dei vaccini, sono stati impiegati uno *score* clinico basato sulla Wisconsin *scoring chart* e due *scoring systems* ecografici; i vitelli sono stati visitati il giorno del reclutamento e della vaccinazione (T0), una settimana dopo (T1), tre settimane dopo per i gruppi A, B e C e quattro settimane dopo per il gruppo D (T2) e infine due settimane dopo il terzo controllo (T3). Sono stati impiegati i test di *Kruskall-Wallis* e di *Dunn* per valutare le differenze statistiche tra i valori medi degli *scores* clinici ed ecografici dei vari gruppi, le temperature rettali ed i punteggi *del global lesion score*; sono stati utilizzati il test del Chi-quadro per valutare le differenze tra le percentuali di animali malati e deceduti e l'*Odds Ratio* per valutare la probabilità di BRD diagnosticata mediante *score* ecografico con i diversi protocolli vaccinali. Lo *score* ecografico ha evidenziato un peggioramento progressivo nel tempo della prevalenza e della gravità delle lesioni polmonari nel gruppo di controllo rispetto ai gruppi sottoposti a vaccinazione, con un risultato migliore nel gruppo che ha ricevuto sia il vaccino intranasale che parenterale. Lo *score* clinico non si è rivelato accurato quanto quello ecografico nell'individuazione degli animali malati, mentre il *global lesion score* ha mostrato alcune differenze. In conclusione, l'ecografia toracica si è dimostrata un valido strumento diagnostico per l'individuazione di soggetti affetti da BRD e la vaccinazione è un efficace strumento di profilassi nei vitelli da latte, soprattutto se associata a una buona gestione degli animali e dell'igiene della stalla.

ABSTRACT

The Bovine Respiratory Disease Complex (BRDC) is a multifactorial respiratory disease syndrome that affects various sectors of the bovine industry, including the dairy sector. It is one of the main causes of morbidity and mortality among pre- and post-weaning calves, resulting in significant economic losses for farmers. Early diagnosis and a valid prophylactic plan are essential in the prevention of this disease.

The aims of this study were to evaluate the effectiveness of different vaccination protocols against BRD in dairy calves, comparing any differences between the routes of administration, and to assess thoracic ultrasound as a diagnostic and screening method.

201 Holstein calves were enrolled in the study; we assigned the animals to a control group (A) or to one of the vaccination groups (intranasal - B, parenteral - C, and both - D). The effectiveness of the vaccination protocols was assessed using a clinical scoring system based on the Wisconsin scoring chart and two ultrasound scoring systems. Statistical analysis was conducted using the Kruskal-Wallis and Dunn tests to evaluate the differences between the mean values of the clinical and ultrasound scores, the rectal temperatures, the global lesion scores. The Chi-square test was used to compare the percentages of sick and dead animals scores across the four groups, while Odds Ratio was used to evaluate the likelihood of being classified as affected by BRD within the different groups.

The ultrasonographic scoring revealed a progressive worsening of the number and severity of lung lesions in the control group compared to the vaccinated groups, especially the one that received both intranasal and parenteral vaccines. The clinical scoring system exhibited lower accuracy in identifying the sick animals, while the global lesion score showed minor differences compared to the ultrasonographic scoring system, but an overall improved agreement.

In conclusion, thoracic ultrasound can be considered a valid diagnostic tool for identifying animals affected by BRD, and both intranasal and parenteral vaccinations were able to reduce the occurrence of BRD in dairy calves, especially when associated with good hygiene and animal husbandry practices.

1. INTRODUZIONE

1.1 LA VITELLAIA NELLE AZIENDE DI VACCHE DA LATTE

La gestione dei vitelli è una componente essenziale del management di una stalla di vacche da latte e pone le basi per una carriera longeva degli animali. Il tasso di mortalità nella vitellaia è un indicatore del benessere e della qualità delle cure prestate ai vitelli ed è una perdita economica per l'allevatore, perché può rendere necessario l'acquisto di rimonta esterna, con annesso rischio di introduzione di malattie nell'allevamento (Santman-Berends et al., 2014).

Parte dei vitelli di sesso femminile viene allevata come rimonta e lo svezzamento si ha a 8-12 settimane (Nielsen et al., 2023). I vitelli maschi, le femmine non impiegate per la rimonta e gli incroci nati da vacche da latte con bassa genetica inseminate con seme di tori da carne costituiscono un surplus di animali che, non essendo destinati alla produzione di latte, vengono trasferiti in stalle per ingrasso (Renaud & Pardon, 2022). Le filiere produttive in cui possono essere inseriti comprendono allevamento di vitelli a carne bianca e di vitelloni (Renaud & Pardon, 2022).

I vitelli a carne bianca sono generalmente maschi di razze da latte che vengono alimentati con sostitutivi del latte e una piccola quantità di foraggio, così da consentire il corretto sviluppo del ruminale, e vengono macellati a meno di 8 mesi d'età (Renaud & Pardon, 2022). La direttiva 2008/119/CE stabilisce che i vitelli debbano ricevere un'alimentazione adeguata alla loro età e peso e conforme alle loro esigenze comportamentali e fisiologiche, comprendente una dose giornaliera di alimenti fibrosi dalla seconda settimana di vita. Inoltre, specifica che il ferro presente negli alimenti deve consentire agli animali di raggiungere un tasso di emoglobina di almeno 4,5 mmol/L.

Gli incroci con razze da carne vengono invece destinati all'ingrasso come vitelloni, che vengono alimentati con concentrati e insilati fino all'età di macellazione, compresa tra 18 e 24 mesi (Renaud & Pardon, 2022).

1.1.1 GESTIONE DEI VITELLI E DELLA VITELLAIA

Il periodo perinatale è uno dei momenti più delicati nella vita di molte specie animali, bovini compresi, e può essere accompagnato da complicazioni che possono mettere a rischio la vita della partoriente e del nascituro (Mee, 2008; Proudfoot, 2019). Per questo motivo è fondamentale puntare ad ottenere un'ottimale gestione dei vitelli neonati, focalizzandosi sulla gestione della vacca nel parto, del parto e delle cure neonatali (Mee, 2008).

È fondamentale garantire una corretta colostratura ai neonati; a tale scopo, è consigliabile valutare la qualità del colostro prima della somministrazione e conservare le eccedenze di colostro di qualità migliore congelandole entro un'ora dalla raccolta e scongelandole, senza superare i 60°C, al bisogno. Queste riserve di colostro possono essere conservate per un anno di tempo e possono essere impiegate nel caso in cui una vacca produca colostro in quantità insufficiente o di qualità scarsa oppure sia affetta da patologie infettive (Godden et al., 2019).

È stato dimostrato che la disinfezione del cordone ombelicale alla nascita, effettuata per immersione in un contenitore con disinfettante, se eseguita correttamente può ridurre della metà la mortalità nella vitellaia e diminuisce la quota di vitelli trattati per patologie respiratorie (Gorden & Plummer, 2010).

Dopo la separazione dalla madre, i vitelli vengono solitamente trasferiti in strutture da stabulazione individuale, che possono essere un "igloo" con un piccolo recinto all'aperto, una gabbietta individuale sollevata dal terreno senza accesso all'esterno oppure un piccolo recinto individuale con lettiera (Nielsen et al., 2023). A seconda della destinazione produttiva, i vitelli possono rimanere in stabulazione individuale fino a 2-5 settimane d'età (se destinati alla produzione di carne) o fino al limite di 8 settimane d'età consentito dalla direttiva 2008/119/CE (se destinati alla rimonta). Dopo questo periodo, vengono spostati in recinti di gruppo o a coppie (Nielsen et al., 2023). Oltre a stabilire il limite di tempo massimo in cui i vitelli possono rimanere in gabbiette individuali, la direttiva europea sancisce anche che i recinti individuali per vitelli, salvo quelli destinati ad isolare gli animali malati, devono avere pareti divisorie traforate che consentano un contatto diretto, visivo e tattile, tra gli animali. È importante garantire una buona igiene dell'ambiente di stabulazione, con una

lettiera asciutta, una buona protezione da temperature estreme, umidità e ventilazione controllate ed evitare il sovraffollamento dei recinti per mantenere bassa la carica microbica ambientale ed evitare stress termici, che possono predisporre i vitelli a BRD, diarrea infettiva e onfalite (Bonizzi et al., 2022).

Fino allo svezzamento, i vitelli dovrebbero essere alimentati con latte o con sostitutivi del latte che soddisfino i fabbisogni di mantenimento e accrescimento dei vitelli sia dal punto di vista energetico che nutrizionale (Wood, 2022). La direttiva 2008/119/CE sancisce che l'alimentazione deve essere garantita almeno due volte al giorno e, a partire dalla seconda settimana di età, ogni vitello deve poter disporre di acqua fresca adeguata in quantità sufficiente, soprattutto in caso di animali malati o esposti a temperature ambientali elevate. Infatti, l'idratazione e il contenuto energetico della dieta influenzano lo sviluppo di una risposta immunitaria efficace e favoriscono l'accrescimento del vitello (Gorden & Plummer, 2010; Krehbiel, 2020; Chase, 2022). Inoltre, una cattiva qualità della razione o una ridotta assunzione di alimento possono portare a carenze energetiche nella dieta, comportando una pesante depressione del sistema immunitario: ad esempio, utilizzare latte di scarto pastorizzato è associato con un tasso di crescita dei vitelli migliore rispetto all'uso di latte ricostituito, probabilmente perché possiede un maggiore contenuto di energia (Gorden & Plummer, 2010; Krehbiel, 2020; Zhang et al., 2022). Anche la modalità di somministrazione della razione è un aspetto fondamentale: la temperatura del latte troppo bassa, l'assunzione di molto latte in poco tempo e la scarsa familiarità con il metodo di somministrazione possono determinare una mancata chiusura della doccia esofagea, permettendo l'ingresso di latte nel rumine. Questo evento generalmente non crea problemi in vitelli appena nati, ma in animali di 2-3 settimane gli zuccheri del latte vengono convertiti ad acidi organici e le proteine vengono scomposte, comportando alterazione della flora microbica ruminale, diarrea, indigestione e conseguente ritardo di crescita (Ellingsen-Dalskau et al., 2020).

Lo svezzamento inizia gradualmente a 4-6 settimane d'età e termina a 8-12 settimane per le vitelle destinate a diventare rimonta negli allevamenti di vacche da latte (Nielsen et al., 2023).

1.1.2 PREVENZIONE DELLE PRINCIPALI PROBLEMATICHE SANITARIE DELLA VITELLAIA

La prevenzione delle patologie nei primi giorni di vita sta acquisendo un'importanza sempre maggiore sia dal punto di vista del benessere dei vitelli che dal punto di vista economico, dato l'impatto che ha sulla mortalità, sulla salute e sulla produttività futura degli animali (Mee, 2008).

In particolare, la mortalità perinatale viene definita come morte prima, durante o entro le 48 h dal parto, dopo un periodo di gravidanza durato almeno 260 giorni. Le cause di mortalità perinatale sono molteplici e comprendono patologie respiratorie combinate ad acidosi metabolica, traumatismi avvenuti durante il parto, ipoglobulinemia, infezioni, carenze congenite e onfaloflebiti (Mee, 2008). I fattori di rischio per la mortalità perinatale includono numero di parti materno, parto gemellare, sesso del nascituro, lunghezza della gestazione, genetica paterna, dimensioni della mandria e stagione di nascita (Mee, 2008). Invece, le cause principali di mortalità entro il primo mese di vita sono legate a patologie gastroenteriche e patologie delle basse vie respiratorie, che sono influenzate principalmente dalle condizioni di stabulazione, dall'*intake* di colostro e dalla gestione alimentare (Bonizzi et al., 2022). Dunque, la gestione del parto, il management della vitellaia e il *modus operandi* dell'allevatore sono connessi alla mortalità nella vitellaia (Santman-Berends et al., 2014).

Il livello di igiene al parto è particolarmente importante nella riduzione della prevalenza della diarrea, delle patologie respiratorie e delle infezioni da Salmonella nei vitelli; se il vitello ha una buona probabilità di contrarre una patologia infettiva dalla madre o se il box parto è particolarmente sporco, è consigliabile spostare quanto prima il neonato nella vitellaia, anche per permettere al personale di stalla di controllare meglio e prima lo stato di salute del vitello ed assicurarsi che la colostratura avvenga nel modo corretto (Mee, 2008; Proudfoot, 2019).

La colostratura è un punto critico per l'acquisizione dell'immunità passiva e per l'assunzione di nutrienti che stimolano la crescita e lo sviluppo del vitello (Godden et al., 2019). Infatti, a causa del tipo di placentazione i vitelli nascono agammaglobulinemici e il trasferimento dell'immunità passiva dipende totalmente dall'assorbimento intestinale nelle prime 24 h dalla nascita (Godden et al., 2019). Dato

che il sistema immunitario di un vitello appena nato non è ancora abbastanza formato da montare una risposta immunitaria soddisfacente contro i patogeni, l'immunità passiva materna costituisce la principale difesa dalle infezioni per le prime 2-4 settimane di vita (Chase, 2022). La concentrazione di IgG sieriche nel neonato dipende dal momento di assunzione, dalla quantità e dalla qualità del colostro; il fallimento del trasferimento dell'immunità passiva si verifica quando questa concentrazione non raggiunge i 10 g/L nelle prime 24-48 h di vita (Godden et al., 2019).

La somministrazione del colostro entro le prime 6 h di vita, oltre ad essere un obbligo imposto dalla direttiva 2008/119/CE, presenta una serie di effetti positivi nel breve e nel lungo termine: riduce la mortalità e la morbilità nel periodo pre-svezzamento, favorisce l'accrescimento, anticipa l'età al primo parto, è associata ad una maggiore produzione di latte durante le prime due lattazioni e ad una minore probabilità di riforma durante la prima lattazione (Godden et al., 2019). Tutto questo è legato probabilmente alla presenza di fattori di crescita per la maturazione dell'epitelio gastrointestinale, per la formazione del microbioma intestinale e per lo sviluppo del sistema immunitario (Chase, 2022). I vitelli dovrebbero assumere una quantità di colostro in L pari al 10-12% del loro peso corporeo (approssimativamente 3-4 L per un vitello di frisona), preferibilmente direttamente dal capezzolo della madre o, se questo non è possibile, con un metodo che consenta la suzione, in modo da stimolare il riflesso della doccia esofagea (Godden et al., 2019). La qualità del colostro viene tradizionalmente valutata sulla base della concentrazione di IgG presenti, che presenta una notevole variabilità individuale a seconda dell'età della vacca, della razza, dell'alimentazione nel preparto e della lunghezza del periodo di asciutta (Godden et al., 2019). Un colostro di buona qualità deve avere almeno 50 g/L di IgG, associabile approssimativamente ad un peso specifico maggiore di 1050; per ottenere una rapida valutazione della qualità del colostro materno prima della somministrazione, si possono utilizzare colostrometri o refrattometri portatili (Godden et al., 2019). Inoltre, per garantire una buona qualità microbiologica, si può effettuare una *total plate count* (TPC) e una conta dei coliformi, oltre a poter pastorizzare o acidificare il colostro per mantenere un adeguato trasferimento di immunità passiva riducendo la carica microbica (Gorden & Plummer, 2010).

Al momento non ci sono dati sufficienti per stilare delle linee guida sul miglior metodo di stabulazione dei vitelli associato alla minor quantità di problemi respiratori (Ollivett, 2020). Tuttavia, è importante puntare a ridurre gli *stressors* ambientali, garantendo condizioni di stabulazione adeguate, con temperatura, umidità ambientale e ventilazione controllate, fornendo acqua sufficiente e somministrando il latte in modo ottimale (Mee, 2008; Ellingsen-Dalskau et al., 2020; Bonizzi et al., 2022). Il tipo di gestione e il grado di pulizia della stalla sono fondamentali per la prevenzione di patologie nella vitellaia (Bonizzi et al., 2022). I fattori di rischio ambientali sono soprattutto legati alla qualità dell'aria (umidità, carica batterica, polverosità e presenza di gas nocivi), alle temperature estreme, all'introduzione nella mandria di animali di differenti provenienze o età nella stessa azienda, alle caratteristiche della lettiera e alla vicinanza con animali di età superiore (Gorden & Plummer, 2010; Smith et al., 2019). È stato osservato un aumento dei segni clinici sia nei vitelli sottoposti a basse che ad alte temperature; alcuni studi evidenziano che i vitelli probabilmente si adattano più facilmente a temperature inferiori se viene garantita loro una buona alimentazione e una lettiera asciutta, ma lo stress da freddo prima dello svezzamento è comunque associato ad un aumento del punteggio ottenuto con gli *scores* respiratori e dell'uso di trattamenti antibiotici (Gorden & Plummer, 2010; van Leenen et al., 2020). Inoltre, i vitelli che si trovano in ambienti con un'alta umidità dell'aria hanno una maggiore probabilità di risultare positivi al *Wisconsin scoring system* e di presentare basofili al BAL, data l'influenza dell'umidità relativa e della temperatura sulla sopravvivenza di alcuni patogeni respiratori (van Leenen et al., 2020). Anche l'esposizione a velocità dell'aria eccessive per tempi prolungati aumenta il rischio di sviluppare patologie respiratorie e, se associata a temperatura ambientale rigida, contribuisce al *cold stress* nei vitelli; probabilmente questo è dovuto al fatto che un ambiente eccessivamente ventilato induce un'inflammation alle vie aeree che può successivamente evolvere a polmonite (van Leenen et al., 2020). Infine, i box individuali dovrebbero essere posizionati in modo da minimizzare l'esposizione a fonti di contaminazione della vitellaia, quali scarico dell'impianto di ventilazione o letamaia, e dovrebbero essere puliti e disinfettati tra un animale e l'altro (Gorden & Plummer, 2010). È consigliabile ridurre i flussi di persone, alimenti e oggetti dalle aree destinate agli animali adulti alla vitellaia, educando il personale a pulire e disinfettare mani e stivali prima di spostarsi dalle vacche ai vitelli

(Gorden & Plummer, 2010). La separazione dei vitelli mediante divisori riduce la trasmissione delle malattie per contatto diretto, mentre è importante una lettiera che consenta un buon *nesting score* (tabella 1), soprattutto nei mesi più freddi (Gorden & Plummer, 2010).

Tabella 1: nesting score. Valuta quanto il vitello viene ricoperto dal materiale di lettiera mentre è in decubito. Nel periodo invernale, l'ideale sarebbe un punteggio pari a 3.

Punteggio	1	2	3
Descrizione	Gran parte dei vitelli giacciono in cima alla lettiera, arti scoperti	Affondano lievemente nella lettiera, arti in parte coperti	Sprofondano nella lettiera, arti non visibili

Fonte: Lago et al., 2006; van Leenen et al., 2020.

L'allevatore dovrebbe anche implementare delle procedure di biosicurezza per limitare l'ingresso di malattie infettive dall'esterno e la diffusione tra i vari settori interni all'allevamento (Gorden & Plummer, 2010; Smith et al., 2019). Tra le misure da mettere in atto consigliate sono comprese: testare i neonati per la ricerca del *Bovine Viral Diarrhea virus* (BVDV) in stalle con alta prevalenza di *Bovine Viral Diarrhea* (BVD) per trovare ed eliminare gli individui persistentemente infetti; effettuare una sistematica pulizia e disinfezione delle strutture, dei mezzi di trasporto e delle attrezzature per la somministrazione del latte e dell'acqua; educare il personale all'impiego adeguato dei dispositivi di protezione individuale (DPI); stabilire e rispettare un preciso flusso per il movimento di animali, persone e attrezzature (Chase, 2022). Inoltre, per prevenire la diffusione di patologie infettive in allevamento è importante istituire una quarantena per gli animali provenienti da altre strutture in una zona ben definita, con gestione corretta dei movimenti del personale e protocolli per l'alimentazione, la vaccinazione, i test diagnostici e la disinfezione delle strutture. Idealmente, gli animali dovrebbero restare in quarantena per almeno 14-21 giorni (Gorden & Plummer, 2010).

Il raggiungimento di un peso corporeo adeguato è associato ad una minore incidenza di patologie e mortalità e ad un accrescimento maggiore; un buon obiettivo da raggiungere sarebbe superare i 50 kg entro 14 giorni d'età per vitelli maschi di Frisona (Renaud & Pardon, 2022). Ci sono diversi fattori condizionanti il peso corporeo, tra cui il peso alla nascita (influenzato a sua volta dalle dal BCS e dall'alimentazione materni),

il management del colostro, la presenza di patologie (l'attivazione del sistema immunitario comporta un aumento del consumo calorico e proteico, con conseguente rallentamento della crescita), il tipo di alimentazione e la quantità della razione (Renaud & Pardon, 2022).

Un'efficace strategia di prevenzione delle patologie nella vitellaia comprende l'adozione di un buon programma vaccinale, per garantire al vitello una buona copertura anticorpale, anche se è necessario ricordare che la vaccinazione da sola non può sostituire la gestione ottimale dell'allevamento (Renaud & Pardon, 2022). Ci sono due possibili opzioni per garantire una copertura vaccinale efficace: vaccinare la madre e garantire una gestione ottimale del colostro, che avrà un aumento della quantità di IgG contro i microrganismi specifici, oppure vaccinare direttamente il vitello (Renaud & Pardon, 2022). Nel secondo caso, si possono impiegare vaccini intranasali anche prima di 7-10 giorni d'età, perché non hanno interazioni particolari con l'immunità materna e l'epitelio mucosale è in grado di esplicare precocemente la sua funzione immunitaria, generando IgA proteggenti (Chase, 2022; Renaud & Pardon, 2022). Invece, i vaccini somministrati per via parenterale con virus vivi attenuati stimolano la risposta immunitaria a partire dai 7-10 giorni d'età e quelli per patogeni batterici non fanno montare un'immunità soddisfacente prima di 3 settimane d'età, con l'eccezione del vaccino contro le tossine di *Cl. perfringens*, che agisce anche a 3 giorni dalla nascita (Chase, 2022). Inoltre, i vaccini più efficienti sono quelli sviluppati contro patogeni virali (*Bovine Herpesvirus 1* - BHV-1, BRSV e BVDV), perché la maggior parte dei batteri patogeni fa parte della normale flora microbica dei bovini ed è endemica (Chase, 2022).

I vaccini con microrganismi vivi attenuati possono essere somministrati per via intramuscolare, intranasale o sottocutanea, sono economicamente più vantaggiosi e danno una buona risposta anticorpale di lunga durata, permettendo di impiegare meno dosi. Tuttavia, possono essere soggetti a rivirulentazione e mutazione, seppur con basse probabilità, e alcuni microrganismi, come BHV-1, possono dare latenza (Chase, 2022). Invece, i vaccini inattivati non presentano il rischio di replicare negli animali vaccinati, ma sono più costosi e richiedono la somministrazione di un maggior numero di dosi; è stato anche dimostrato che sono in grado di generare un *boost* dell'immunità acquisita da vaccini vivi attenuati (Chase, 2022).

È essenziale progettare i programmi vaccinali sulla base dei patogeni rilevati in stalla, cercando di puntare ad ottenere una buona immunità per i microrganismi più comuni nell'allevamento o con patogenicità e virulenza particolarmente elevate (Chase, 2022).

In uno studio condotto sulla gestione della vitellaia in alcuni allevamenti olandesi è emerso che alcuni allevatori possono essere convinti di avere sufficienti conoscenze per una corretta gestione della vitellaia, ma si trovava in difficoltà nel metterle in pratica; inoltre, sempre in questo studio un discreto numero di allevatori non si era reso conto di avere una mortalità eccessivamente elevata rispetto alla media nazionale (Santman-Berends et al., 2014). Il ruolo del veterinario aziendale come consulente per l'allevatore è fondamentale in questi casi, sia per garantire il benessere della vitellaia che per migliorare la redditività dell'azienda (Santman-Berends et al., 2014).

1.2 BOVINE RESPIRATORY DISEASE COMPLEX (BRDC)

1.2.1 AGENTI PATOGENI RESPONSABILI DI BRD

La *Bovine Respiratory Disease* (BRD), o *Bovine Respiratory Disease Complex* (BRDC), è una sindrome respiratoria ad eziologia multifattoriale causata da numerosi agenti microbici, da fattori individuali legati alla risposta immunitaria dell'ospite e da fattori ambientali sfavorevoli, che sommati risultano in una broncopolmonite (Mosier, 2014).

Generalmente i virus determinano un'infezione primaria associata a segni clinici di lieve entità e immunosoppressione. Quest'ultima può favorire successive infezioni secondarie da parte di più batteri, anche facenti parte della normale flora microbica delle vie respiratorie, quali *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni*. Talvolta alcuni batteri, come *M. haemolytica*, possono agire come patogeni primari senza pre-infezione virale (Grissett et al., 2015).

Dato che gli agenti eziologici coinvolti sono numerosi e che taluni sono patogeni opportunisti, spesso diventa complicato isolare i batteri o virus responsabili della sintomatologia dai focolai (Grissett et al., 2015). Inoltre, a seconda dell'interazione tra sistema immunitario dell'ospite e dose infettante, alcune infezioni da patogeni primari possono non causare sintomatologia clinica (Pardon & Buczinski, 2020).

Tabella 2: principali agenti eziologici associati alla BRD.

Virus	Batteri	Agenti di altra natura
<ul style="list-style-type: none"> • Bovine herpesvirus di tipo 1 (BHV-1) • Parainfluenza-3 virus (PI3) • Bovine viral diarrhea virus (BVDV) • Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) • Importanza secondaria: Rhinovirus, Reovirus, Circovirus, Adenovirus, Coronavirus 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Mannheimia haemolytica</i> • <i>Mycoplasma bovis</i> (e altri micoplasmi: <i>M. californicum</i>, <i>M. dispar</i>, <i>Ureaplasma</i>) • <i>Pasteurella multocida</i> • <i>Histophilus somni</i> • Importanza secondaria: <i>Arcanobacterium pyogenes</i>, <i>Bibersteinia trehalosi</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Trueperella pyogenes</i>, <i>Chlamidia</i> spp. 	<ul style="list-style-type: none"> • Parassiti: <i>Dictyocaulus viviparus</i> • Miceti: <i>Aspergillus</i> spp. • Agenti pneumotossici: D, L-tryptofano

Fonte: Lekeux & Coghe, 2007; Grissett et al., 2015.

1.2.1.2 VIRUS

Bovine herpesvirus 1 (BHV-1). È un virus a dsDNA con envelope appartenente alla famiglia degli Herpesviridae, responsabile della rinotracheite infettiva (*Infectious Bovine Rhinotracheitis* - IBR), della vulvovaginite pustolosa (*Infectious Pustular Vulvovaginitis* - IPV) e della balanopostite (*Infectious Pustular Balanoposthitis* - IBP). L'IBR si trasmette mediante contatto diretto e indiretto; il virus replica nelle cellule delle prime vie aeree e dei bronchi, danneggiando sia le prime vie respiratorie che le basse vie (Smith et al., 2019). In particolare, determina una rinite da sierosa a mucopurulento-necrotica, con perdita di ciglia dell'epitelio tracheale e formazione di membrane difteriche, e altera le proprietà del surfactante. Inoltre, ha anche un effetto immunomodulatore, in quanto compromette la funzionalità dei macrofagi alveolari, deprime l'immunità cellulo-mediata e umorale e stimola l'espressione di recettori per le leucotossine prodotte da *M. haemolytica* (Smith et al., 2019).

Per evadere la risposta immunitaria sfrutta il peculiare meccanismo della latenza, che si realizza nelle cellule nervose del ganglio del trigemino o, secondariamente, a livello tonsillare; il virus rimane silente in queste sedi fino a quando si verifica un calo delle difese immunitarie (Smith et al., 2019).

BHV-1 è ampiamente diffuso nella popolazione bovina, con i bovini adulti che fungono da reservoir. La prevalenza è maggiore negli allevamenti intensivi di vacche da latte e vitelloni, mentre sembra meno diffuso tra i vitelli da latte (Smith et al., 2019).

Parainfluenza-3 virus (PI-3). È un virus respiratorio ubiquitario facente parte della famiglia Paramyxoviridae. Possiede ssRNA ed è dotato di envelope. La trasmissione di questo agente avviene tramite *expirium* o per contatto diretto; la replicazione avviene a livello di cellule epiteliali ciliate della mucosa respiratoria, a cui segue il danneggiamento dell'apparato mucociliare e la conseguente predisposizione allo sviluppo di infezioni batteriche secondarie (Smith et al., 2019).

Bovine Viral Diarrhea virus (BVDV). Si tratta di un virus a ssRNA con envelope appartenente alla famiglia Flaviviridae e al genere Pestivirus e comprendente 3 genotipi (BVDV-1, BVDV-2, BVDV-3). La principale via d'infezione è oro-nasale. All'ingresso nell'organismo segue la replicazione nelle cellule epiteliali (soprattutto

tonsillari) e la successiva viremia (con il virus libero nel sangue o associato a leucociti). In genere gli animali guariscono in seguito alla comparsa di anticorpi, rilevabili circa due settimane dopo l'inizio dell'infezione (Smith et al., 2019).

L'infezione da BVDV determina erosioni a livello di mucosa digerente e respiratoria e immunodepressione, favorendo l'insorgenza di infezioni secondarie da parte di altri patogeni e di sindromi respiratorie.

Sulla base dell'effetto citopatico che si manifesta nelle colture cellulari e dell'espressione genomica del marker molecolare NS3, si possono distinguere i due biotipi citopatico (CP) e non citopatico (NCP). I biotipi NCP sono in grado attraversare la placenta e invadere il feto, causando aborto se l'invasione avviene entro il 110° giorno di gravidanza e nascita di soggetti persistentemente infetti se si sviluppa dopo i 120 giorni. Inoltre, BVDV è stato associato ad un'alta incidenza delle patologie delle vie respiratorie in vitelli di meno di tre mesi d'età (Raaperi et al., 2012).

Bovine Respiratory Syncytial virus (BRSV). È un virus a ssRNA con envelope appartenente alla famiglia dei Paramyxoviridae (sottofamiglia dei Pneumoviridae). La trasmissione può avvenire principalmente per contatto diretto o per aerosol. Può provocare bronchite, bronchiolite, polmonite interstiziale cranio-ventrale accompagnata da edema ed enfisema secondario a bronco-costrizione (Larsen, 2000). La replicazione di BRSV determina come principale alterazione citopatologica la fusione tra le cellule, con formazione di sincizi a livello di mucosa nasale e tracheale e di epitelio bronchiolare e alveolare. Questi danni causati alle cellule epiteliali, uniti alla riduzione della funzionalità dei macrofagi alveolari, comportano una maggiore suscettibilità dell'ospite alle infezioni batteriche secondarie (Larsen, 2000). BRSV è particolarmente diffuso tra i vitelli e può causare malattia anche molto precocemente, dato che l'immunità materna protegge il neonato solo parzialmente dopo l'infezione (Raaperi et al., 2012).

Rhinovirus, Adenovirus, Influenzavirus e Coronavirus sono agenti virali di importanza secondaria rispetto a quelli sopracitati, ma contribuiscono comunque ad alterare la funzionalità dell'apparato mucociliare e conseguentemente a permettere la colonizzazione delle vie aeree da parte di altri patogeni (Pancieria & Confer, 2010; Studer et al., 2021).

1.2.1.2 BATTERI

I vari agenti batterici frequentemente coinvolti nella patogenesi della BRD fanno parte della normale flora microbica del nasofaringe e sono ubiquitari nella popolazione bovina. Sono patogeni opportunisti che proliferano e si diffondono nell'apparato respiratorio a seguito di eventi stressanti o infezioni virali che minano le normali barriere immunitarie (Confer, 2009).

Mannheimia haemolytica. È un coccobacillo Gram negativo, anaerobio facoltativo, appartenente alla famiglia delle Pasteurellaceae e normalmente residente a livello di nasofaringe e tonsille dei bovini. Prende il sopravvento quando una situazione di stress riduce le difese immunitarie dell'ospite, diffondendosi fino alle vie respiratorie inferiori; è inoltre l'agente patogeno responsabile della febbre da trasporto o *shipping fever* (Confer & Ayalew, 2018). Nonostante non sia associato all'insorgenza di patologie respiratorie nei vitelli da latte con la stessa frequenza di altri batteri, è comunque una possibile causa di broncopolmonite nella vitellaia (Smith et al., 2019).

Possiede diversi fattori di virulenza con funzione di adesione alla mucosa dell'apparato respiratorio, come adesine, fimbrie, polisaccaridi capsulari e neuraminidasi, con effetto immunomodulatore (leucotossine, proteasi clivanti immunoglobuline), protettivo (capsula che previene la fagocitosi) e proinfiammatorio, come l'endotossina lipopolisaccaride A (Confer & Ayalew, 2018).

Pasteurella multocida. È un coccobacillo Gram negativo, anaerobio facoltativo, immobile, appartenente alla famiglia delle Pasteurellaceae (Poli et al., 2017). È un microrganismo commensale delle prime vie respiratorie del bovino e viene comunemente isolato in animali sani, ma è stato anche identificato come patogeno responsabile della polmonite neonatale del vitello e della *shipping fever*; queste ultime sono entrambe sintomatologie ad eziologia multifattoriale e favorite dall'abbassamento delle difese immunitarie dovuto a condizioni ambientali inadeguate, cambiamenti climatici, stress alimentare, stress da trasporto o coinfezioni da altri agenti patogeni immunosoppressivi della BRD (Dabo et al., 2008). In particolare, la polmonite neonatale del vitello si manifesta principalmente con un picco tra le 4 e le 6 settimane di vita e tra i 2 e i 6 mesi d'età (Dabo et al., 2008).

Come fattori di virulenza, presenta fattori di adesione, come fimbrie ed emoagglutinine, di immunomodulazione (LPS A) e difensivi, tra cui una citotossina che stimola un riarrangiamento del citoscheletro, una capsula polisaccaridica che riduce l'*uptake* da parte dei macrofagi e l'attività battericida del complemento, proteasi degradanti immunoglobuline e riducenti l'opsonizzazione (Dabo et al., 2008).

Histophilus somni. Precedentemente denominato *Haemophilus somnus*, è un coccobacillo Gram negativo, appartenente alla famiglia delle Pasteurellaceae, immobile, non sporigeno, senza capsula. Si tratta di un microrganismo normalmente residente sulle mucose delle prime vie aeree e dell'apparato genitale, ma associato a numerosi processi patologici, tra cui polmonite enzootica e *shipping fever* (Confer, 2009).

Tra i suoi fattori di virulenza sono compresi lipooligosaccaridi (mediatori dell'apoptosi delle cellule endoteliali), proteine di membrana leganti transferrina e *immunoglobulin-binding proteins* (responsabili della resistenza alla lisi mediata da complemento). Inoltre, è in grado di produrre istamina (potenziale amplificatrice di lesioni respiratorie primarie) ed è stata recentemente documentata la capacità di produrre biofilm in vivo (Confer, 2009).

Mycoplasma bovis, Si tratta di un batterio di piccole dimensioni, pleomorfo in quanto privo di parete cellulare, appartenente alla classe *Mollicutes* (Poli et al., 2017). È un patogeno extracellulare normalmente presente a livello di epitelio respiratorio e che determina una sintomatologia in seguito a stress ambientali (trasporto, svezzamento, ricomposizione dei gruppi) e in coinfezione con altri batteri o virus (Confer, 2009; Perez-Casal, 2020). In uno studio effettuato su focolai di BRD rilevati tra il 2009 e il 2019 in Italia, *M. bovis* è stato il patogeno individuato più frequentemente, spesso in associazione con altri agenti patogeni della BRD, in primis *H. somni* (Marsilio et al., 2021). Inoltre, è stato associato all'insorgenza di lesioni polmonari in vitelli di meno di un mese d'età (Francoz et al., 2015).

Tra i fattori di virulenza posseduti da *M. bovis*, si annoverano proteine di superficie variabili (VSPs), che giocano un ruolo nell'adesione, nella colonizzazione e nell'evasione della risposta umorale dell'ospite (Poli et al., 2017; Perez-Casal, 2020).

1.2.2 PATOGENESI DELLA BRD

La BRD è una sindrome ad eziologia complessa, che dipende dall'interazione tra numerosi fattori legati agli agenti patogeni, all'ospite e all'ambiente. Lo stress e le condizioni ambientali avverse predispongono l'animale a infezioni da virus o altri agenti eziologici che danneggiano la mucosa respiratoria e alterano la risposta immunitaria, permettendo la proliferazione di patogeni secondari, generalmente responsabili dell'insorgenza di una broncopolmonite fibrino-purulenta (Mosier, 2014).

Spesso i vitelli sono sottoposti a condizioni stressanti, quali lo svezzamento, il trasporto, la difficoltà di accesso ad alimento e acqua, le temperature ambientali eccessivamente alte: tutti questi fattori contribuiscono ad aumentare la predisposizione per lo sviluppo di BRD (Mosier, 2014). Anche la presenza di una predisposizione genetica, di patologie concomitanti, di errori nella colostratura o di carenze dietetiche possono favorire la diffusione e la proliferazione di microrganismi (anche endogeni) che causano affezioni delle vie aeree superiori o inferiori, con conseguente sviluppo dei segni clinici (Mosier, 2014; McGill & Sacco, 2020). Ci sono inoltre diversi fattori anatomici, fisiologici e immunologici che rendono i bovini proni allo sviluppo di polmoniti, tra cui ampio volume dello spazio morto, scarsa ventilazione collaterale, grande quantità di macrofagi intravascolari a livello polmonare e di linfociti T gamma-delta circolanti (Mosier, 2014). Dunque, il sistema immunitario di per sé è in grado di proteggere i polmoni da infezioni da parte di microrganismi patogeni, ma la combinazione di fattori predisponenti può ridurre le difese dell'ospite (McGill & Sacco, 2020).

La prima fase di sviluppo della malattia è generalmente rappresentata dall'instaurarsi di un'infezione virale, spesso autolimitante, che danneggia la mucosa dell'apparato respiratorio. Le infezioni da BHV-1, PI-3, BRSV e BVDV possono essere associate a sintomatologia acuta e BHV-1 è in grado di causare lesioni gravi a livello di alte vie respiratorie (Pancieria & Confer, 2010). Gli agenti patogeni virali causano una disfunzione del sistema mucociliare, che è il primo sistema di difesa dell'apparato respiratorio, formato da cellule mucipare e ciliate e con il compito di rimuovere particelle estranee e microrganismi inalati. I danni causati dalle infezioni primarie causano la riduzione della *clearance* delle vie aeree e l'erosione della superficie

mucosale, predisponendo alle infezioni batteriche secondarie (Panciera & Confer, 2010; McGill & Sacco, 2020; Smith et al., 2020). Anche alcuni batteri, come *M. haemolytica* o *M. bovis*, possono agire come patogeni primari senza pre-infezione virale (Grissett et al., 2015; Perez-Casal, 2020).

In presenza di insulti all'epitelio delle vie aeree, vengono prodotte delle citochine pro-infiammatorie che determinano l'attivazione dell'immunità innata, con reclutamento di neutrofili, granulociti e cellule *natural-killer*, e l'inizio della risposta di fase acuta sistemica. Questa risposta è caratterizzata a livello sistemico da febbre, anoressia, iper-coagulabilità, aumento della cortisolemia, leucocitosi e alterata produzione delle proteine di fase acuta da parte del fegato, con associato catabolismo muscolare al fine di reperire gli aminoacidi necessari. L'incremento del metabolismo tissutale generale e della mobilitazione amminoacidica determina la riduzione dell'accrescimento ponderale e della produttività (Krehbiel, 2020).

Inoltre, gli antigeni patogeni vengono processati dalle *antigen-presenting cells* o APC (monociti, macrofagi, cellule dendritiche), fondamentali per l'induzione di un'efficace risposta immunitaria acquisita umorale e cellulo-mediata. Alcuni virus (tra cui BVDV e PIV) interferiscono con l'azione delle APC, inibendo in particolar modo la fagocitosi, la produzione di TNF- α e/o lo scoppio ossidativo nei macrofagi (McGill & Sacco, 2020).

Per quanto riguarda l'immunità acquisita di tipo umorale, i linfociti B si attivano diventando plasmacellule in grado di produrre anticorpi con varie funzioni, tra cui neutralizzare i patogeni virali ed i batteri della famiglia delle *Pasteurellaceae*. Anche l'immunità cellulo-mediata gioca un ruolo nella guarigione e nella prevenzione della BRD, con i linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ che legano gli antigeni di superficie di diversi patogeni, tra cui BHV-1, BRSV e BVDV (Poli et al., 2017; McGill & Sacco, 2020).

Molti patogeni riescono ad eludere le difese immunitarie e favorire l'instaurarsi dell'infezione impiegando diversi meccanismi, tra cui alterata funzionalità dei macrofagi alveolari, soppressione della proliferazione dei cloni linfocitari e induzione dell'apoptosi, alterazione del rilascio di citochine e altri mediatori dell'infiammazione (Panciera & Confer, 2010; Mosier, 2014). Tutto ciò è reso possibile dalla presenza di fattori di virulenza come adesine, tossine, enzimi, proteine di superficie variabili che

consentono l'insorgenza di varianti antigeniche (come nel caso di *Mycoplasma bovis*) o la formazione di biofilm (Mosier, 2014; McGill & Sacco, 2020).

La maggior parte dei batteri comunemente presenti in casi di BRD hanno la capacità di produrre biofilm, in particolar modo *Histophilus somni* e *Pasteurella multocida*. Il biofilm protegge le colonie batteriche presenti al suo interno dalla risposta immunitaria e dagli antimicrobici o altre sostanze dannose per la loro sopravvivenza; inoltre, le colonie sono in grado di regolare la produzione di fattori di virulenza e di antimicrobicoresistenza (Mosier, 2014). Nel caso in cui fossero alterate la concentrazione di nutrienti, ossigeno, temperatura e altri fattori influenzanti la proliferazione batterica, si libererebbero dal biofilm batteri *free-living* in grado di colonizzare porzioni più profonde di parenchima polmonare, estendendo l'infezione. Una volta stabiliti, i batteri sono responsabili della broncopolmonite, tipicamente associata ad un aggravamento della sintomatologia (Mosier, 2014).

Quando i batteri patogeni riescono ad attecchire a livello polmonare, inizialmente colonizzano la giunzione bronco-alveolare, sopraffanno le difese dell'ospite, stimolano un'inflammatione locale e si diffondono verso le vie aeree o il parenchima polmonare adiacente (Pancieria & Confer, 2010). Tale processo può generare tre possibili patterns di polmonite, classificabili sulla base dell'essudato in broncopolmonite purulenta (o broncopolmonite lobulare), polmonite o pleuropolmonite fibrinosa (o polmonite lobare) e polmonite caseo-necrotica (o polmonite da micoplasmi). L'evoluzione ad una tipologia di polmonite rispetto all'altra dipende dal primo sito di localizzazione batterica nelle vie aeree, dai fattori di virulenza batterici presenti, dalla resistenza dell'ospite, dalla velocità e dal metodo di diffusione dell'infezione all'interno dei polmoni (Pancieria & Confer, 2010).

Dopo la diffusione, i batteri stimolano la risposta immunitaria dell'ospite, determinando il rilascio di mediatori dell'inflammatione che provocano vasodilatazione e chemiotassi. Di conseguenza, si ha formazione di edema, richiamo di neutrofili e precipitazione di fibrina a livello di interstizio e vie aeree inferiori, seguiti da disaccoppiamento tra ventilazione e perfusione e ridotta ossigenazione del sangue. Tutto questo processo porta a tachipnea e stress respiratorio (Bassel et al., 2020).

1.2.3 SINTOMATOLOGIA CLINICA DELLA BRD

Sebbene i vari agenti eziologici della BRD siano molto diffusi nella popolazione bovina, non tutti gli animali si ammalano, né presentano una sintomatologia clinica della medesima entità; al contrario, alcuni vitelli possono non manifestare affatto alcun segno clinico (Bassel et al., 2020). Il decorrere asintomatico dell'infezione può essere dovuto al fatto che alcuni vitelli sono già immunizzati nei confronti dei patogeni o che sono in grado di sviluppare rapidamente un'efficace risposta immunitaria, innata o acquisita, tale da consentire la clearance del patogeno prima dello sviluppo della sintomatologia; talvolta un animale può anche essere ritenuto erroneamente asintomatico se il personale di stalla non rileva la sintomatologia (Bassel et al., 2020).

I vitelli affetti da broncopolmonite possono presentare generalmente segni clinici localizzati al tratto respiratorio o segni sistemici per una risposta infiammatoria generalizzata (Smith et al., 2019). Nelle fasi iniziali, i sintomi sono frequentemente aspecifici e comprendono apatia, depressione del sensorio, letargia, movimenti lenti, orecchie e testa basse, riduzione dell'ingestione e ridotta interazione con i conspecifici (Smith et al., 2019). Anche l'ipertermia (temperatura rettale superiore a 39,5°C) è uno dei primi sintomi rilevabili di BRD, ma è di breve durata e, al contrario, la temperatura corporea media tende a ridursi in animali con gravi segni di patologia e ampie aree di polmone consolidato (Wolfger et al., 2015; Baruch et al., 2019; Maier et al., 2019).

Alla visita clinica si possono evidenziare anche difficoltà respiratoria con dispnea inspiratoria ed espiratoria e atteggiamento di fame d'aria (postura caratterizzata da testa estesa e abduzione dei gomiti), scolo nasale e/o oculare di natura da sierosa a mucopurulenta, frequente lambimento del musello, tosse produttiva e scialorrea. All'auscultazione toracica possono rivelarsi eventuali rumori respiratori anomali (crepitii, fischi, rumori da sfregamento delle pleure) e alterazioni del murmure vescicolare; in caso di consolidamento delle porzioni ventrali dei lobi, alla percussione si denota una maggiore ottusità rispetto alla norma nella parte interessata (Maier et al., 2019; Smith et al., 2019). Tuttavia, alcuni animali possono risultare clinicamente sani o con sintomatologia lieve pur sviluppando lesioni polmonari gravi: in uno studio effettuato su 24 vitelli di età inferiore a 12 settimane, 16 animali presentarono aree di consolidamento polmonare evidenziate all'esame ecografico e/o all'esame anatomo-

patologico pur manifestando segni clinici lievi o assenti (Ollivett et al., 2015; Bassel et al., 2020). Questo può essere dovuto al fatto che la sintomatologia dipende fortemente dalla risposta immunitaria dell'ospite: tachipnea e dispnea possono verificarsi se l'interstizio alveolare è invaso da edema, neutrofili e fibrina e/o se l'eccessiva vasodilatazione porta all'alterazione del normale rapporto ventilazione/perfusione e genera *shunt* che riducono la concentrazione di ossigeno nel sangue (Bassel et al., 2020). Anche l'eventuale sviluppo di sepsi durante le forme acute di polmonite può andare ad aggravare il quadro clinico, soprattutto a causa della massiva produzione di citochine e fattori dell'infiammazione e dei conseguenti danni anche agli altri apparati (Bassel et al., 2020).

Infine, è importante considerare che i segni di BRD sono molto aspecifici: ad esempio, l'aumento della frequenza respiratoria può essere associato a stress da caldo o eccitazione, così come la tosse si può rinvenire anche in vitelli che vivono in ambiente particolarmente polveroso. Inoltre, nel momento in cui si manifestano i segni clinici più caratteristici di una broncopneumopatia (tosse, abbondante scolo nasale mucopurulento, dispnea, febbre alta), gli animali possono essere già in uno stadio avanzato della patologia o possono manifestare una riacutizzazione della patologia cronica, quindi le probabilità di ottenere una risposta positiva alla terapia sono ridotte (Maier et al., 2019; Smith et al., 2019). Anche nel caso in cui vitelli siano affetti da forme croniche, si osserva una riduzione del BCS e segni di cachessia, che però sono segni altrettanto aspecifici (Maier et al., 2019).

1.2.4 DIAGNOSI DI BRD

La diagnosi di BRD è complessa, anche per la mancanza di un test diagnostico *gold standard* in vivo (Buczinski et al., 2014). Tuttavia, una diagnosi accurata è fondamentale per stabilire un piano terapeutico appropriato e trattare tutti gli animali malati, evitando un utilizzo inappropriato degli antimicrobici (Berman et al., 2019). Sono state svolte numerose ricerche per cercare di standardizzare la diagnosi in base ai segni clinici, proponendo diverse combinazioni di questi al fine di facilitare il monitoraggio e la valutazione degli animali da parte del veterinario, degli allevatori e personale di stalla (Buczinski & Pardon, 2020).

Una volta individuati gli animali clinicamente sospetti di essere affetti da BRD, si utilizzano strumenti di diagnostica collaterale quali diagnostica per immagini, indagini sierologiche, colturali, ematologiche o biochimiche (Smith et al., 2020). L'obiettivo finale è cercare di aumentare sensibilità e specificità della diagnosi, identificare i principali patogeni coinvolti e optare per le opzioni terapeutiche più appropriate. Naturalmente è importante associare alle metodiche diagnostiche una buona raccolta anamnestica e l'ispezione attenta delle strutture e degli animali, volte alla ricerca di fattori di rischio per la BRD e alla successiva scelta del miglior iter diagnostico e terapeutico possibili. È bene anche esaminare il tipo di alimentazione, il programma vaccinale e la capacità degli operatori di rilevare casi di patologia respiratoria in atto (Gorden & Plummer, 2010).

I test diagnostici possono essere di *screening* o di conferma; i test di *screening* vengono usati in modo seriale e devono essere accessibili, semplici da effettuare e possibilmente economici e vengono poi seguiti da test di conferma solo negli animali risultati positivi allo *screening* (Buczinski & Pardon, 2020).

1.2.4.1 VISITA CLINICA E *SCORING SYSTEM*

La diagnosi clinica di BRD si basa *in primis* sull'osservazione dei segni respiratori e sistemici associati all'auscultazione toracica (Cummings et al., 2022). Questi metodi permettono di considerare le diverse opzioni diagnostiche e terapeutiche senza ricorrere a metodiche o apparecchiature complesse e costose. Tuttavia, la valutazione clinica in sé può avere una sensibilità e specificità del 60% circa, perché è soggettiva, si basa sulla presenza di segni clinici associati anche a patologie gastroenteriche o setticemiche, non permette di distinguere tra affezioni delle vie respiratorie alte e basse, non consente l'identificazione della patologia in animali asintomatici e talvolta i sintomi possono passare inosservati (Ollivett & Buczinski, 2016; Bassel et al., 2020; Cummings et al., 2022). Anche l'auscultazione toracica è fortemente operatore-dipendente, ha una sensibilità del 63% e una specificità del 46% nell'individuazione del consolidamento polmonare e della BRD attraverso l'evidenziazione di rumori respiratori anomali (Maier et al., 2019; Pardon & Buczinski, 2020). Queste alterazioni possono essere causate da variazioni del diametro delle vie









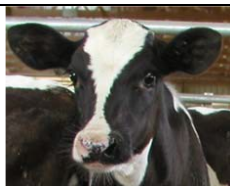







aeree, che determina un flusso turbolento con formazione di rantoli, dall'accumulo di essudato mucopurulento nell'albero respiratorio, che causa crepitii (Buczinski et al., 2014). Si può anche evidenziare l'aumento del murmure vescicolare, in particolare a livello di lobi ventrali e medio, oppure la sua assenza in concomitanza di aree di consolidamento polmonare (Buczinski et al., 2014).

Per ovviare a parte dei problemi legati alla soggettività della valutazione clinica, sono stati sviluppati diversi *scoring systems* che danno un punteggio all'animale sulla base della tipologia e gravità della sintomatologia, in modo da avere un valore numerico il più oggettivo, ripetibile e comparabile possibile. Per i vitelli delle aziende da latte pre-svezamento, esistono due *scoring systems* particolarmente noti, sviluppati dalle università del Wisconsin e della California (Cummings et al., 2022).

Il Wisconsin *scoring system*, illustrato dalla tabella 3, prende in considerazione temperatura rettale, tosse, scolo nasale, scolo oculare, posizione di testa e orecchie e aspetto delle feci. La misurazione della temperatura rettale può essere un'importante fonte di stress e può determinare un lieve rialzo parafisiologico della temperatura; perciò, si consiglia di effettuare la misurazione della temperatura dopo aver svolto tutte le altre manualità (Maier et al., 2019). A ognuno dei sei segni clinici elencati viene attribuito un punteggio da 0 a 3 a seconda che siano assenti (0) oppure siano presenti con entità lieve (1), moderata (2) o grave (3). La somma dei punteggi attribuiti a ciascun sintomo stabilisce lo *score* totale, compreso tra 0 e 18 punti. Inizialmente venivano considerati sani i vitelli che totalizzavano un punteggio inferiore a 3, mentre quelli che arrivavano almeno a 5 erano considerati a rischio più alto di presentare patologia respiratoria (McGuirk & Peek, 2014). Tuttavia, sono stati evidenziati alcuni limiti di questo sistema, come la ridotta concordanza tra osservatori dovuta alla distinzione della gravità della sintomatologia, rispetto ad esempio a sistemi più dicotomici (assenza vs presenza di segni) oppure l'attribuzione della stessa importanza ad ogni sintomo, sia dal punto di vista clinico che di rischio di essere affetto dalla patologia (Buczinski & Pardon, 2020). Inoltre, si è notato questo sistema attribuisce un'eccessiva importanza all'aumento di temperatura rettale, che può essere legato anche a fattori non associati a BRD (come la temperatura ambientale o lo stress). Per questo diversi studi più recenti suggeriscono di considerare malati gli animali che presentano almeno due parametri clinici con punteggio pari o superiore a 2 (Decaris et al., 2022). Sulla base del risultato,

si decide se trattare gli individui considerati malati o tenere sotto osservazione gli animali con segni di entità moderata (Hussein et al., 2018).

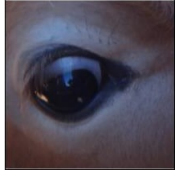
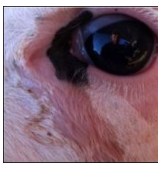

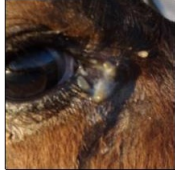
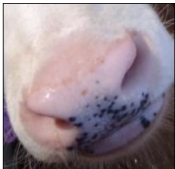
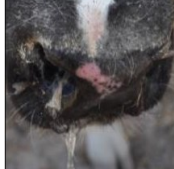

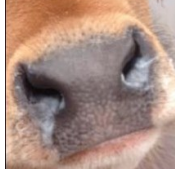
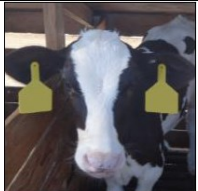


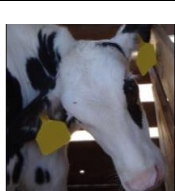
Tabella 3: Wisconsin scoring system. Se il punteggio è ≥ 2 per almeno due parametri clinici, l'animale ha una maggiore probabilità di essere affetto da patologia respiratoria.

Calf Health Scoring Criteria			
0	1	2	3
Rectal temperature			
100-100.9 °F 37,7-38,2 °C	101-101.9 °F 38,3-38,8 °C	102-102.9 °F 38,9-39,3 °C	≥ 103 °F $\geq 39,4$ °C
Cough			
None	Induced single cough	Induced repeated coughs or occasional spontaneous cough	Repeated spontaneous coughs
Nasal discharge			
Normal serous discharge	Small amount of unilateral cloudy discharge	Bilateral, cloudy or excessive mucus discharge	Copious bilateral mucopurulent discharge
			
Eye scores			
Normal	Small amount of ocular discharge	Moderate amount of bilateral discharge	Heavy ocular discharge
			
Ear scores			
Normal	Ear flick or head shake	Slight unilateral droop	Head tilt or bilateral droop
			
Fecal scores			
Normal	Semi-formed, pasty	Loose, but stays on top of bedding	Watery, sifts through bedding
			

Fonte: Wisconsin Calf Health Scoring Chart, 2018.

Lo *scoring system* elaborato presso l'Università della California, riassunto nella tabella 4, prende in considerazione tosse, scolo nasale, scolo oculare, postura di testa ed orecchie, pattern respiratorio (tachipnico e/o dispnoico) e temperatura rettale. Con questo sistema, all'assenza di segni clinici corrisponde ad un punteggio pari a 0, mentre se presenti viene assegnato un diverso punteggio a seconda del sintomo considerato, senza tener conto della gravità (Maier et al., 2019). L'animale viene considerato malato se la somma dei punteggi è uguale o superiore a 5.

Tabella 4: parametri clinici impiegati nello *scoring system* dell'università della California. Se la somma del punteggio associato a ciascun segno clinico è ≥ 5 , il vitello potrebbe avere BRD.

Clinical sign	Score if normal	Score if abnormal		
Eye discharge	0 	2 		
Nasal discharge	0 	4 		
Ear droop or Head tilt	0 	5 		
Cough	0 No cough	2	Spontaneous cough	
Breathing	0 Normal	2	Rapid or difficult breathing	
Temperature	0 $< 102.5\text{ }^{\circ}\text{F}$ $< 38,9\text{ }^{\circ}\text{C}$	2	$\geq 102.5\text{ }^{\circ}\text{F}$ $\geq 38,9\text{ }^{\circ}\text{C}$	

Fonte: Aly et al., 2014.

Confrontando i due sistemi, alcuni studi hanno rilevato una sensibilità e una specificità maggiore per il Wisconsin *system* (rispettivamente 77,9% e 81,9% versus 67,1% e 79,1%), mentre altri hanno evidenziato una maggiore sensibilità del Californian *system* (in particolare 72,6% per il Californian e 71,1% per il Wisconsin), ma hanno confermato la maggiore specificità del Wisconsin *system* (91,2% versus

87,4%) (Decaris et al., 2022). La differenza di specificità potrebbe essere attribuita all'adozione di livelli di intensità di ciascun segno clinico presente nel Wisconsin *system* ma non nel Californian, che aumenta la probabilità di avere dei falsi positivi. Nonostante questo svantaggio, il Californian *system* è più rapido nella raccolta dei dati e presenta una minore necessità di manipolare dei vitelli (Love et al., 2016).

La differenza di specificità e sensibilità del Wisconsin *system* tra gli studi potrebbe essere legata alla differente distinzione tra individui positivi e negativi: alcuni studi considerano positivi gli animali che totalizzano un punteggio globale pari o superiore a 5, mentre altri scelgono come distinzione la presenza di almeno due segni clinici con punteggio pari o superiore a 2. Questo implica che la corretta definizione dei valori che distinguono gli individui sani da quelli malati è fondamentale ai fini di ottenere una buona sensibilità e specificità diagnostiche (Decaris et al., 2022).

1.2.4.2 DIAGNOSTICA COLLATERALE

La diagnostica per immagini è un utile strumento per confermare la presenza di lesioni polmonari. Si possono impiegare diverse tecniche, tra cui radiografia, ecografia e tomografia assiale computerizzata, ma tra queste l'ecografia è più facilmente applicabile in campo (Buczinski & Pardon, 2020). Infatti, è stata dimostrata una buona concordanza tra i reperti ecografici e quelli radiografici e anatomopatologici ed è di esecuzione rapida e semplice anche in campo. È una metodica in grado di fornire informazioni sulle condizioni dello spazio pleurico e della porzione superficiale di parenchima polmonare attraverso la ricerca di alterazioni quali *comet tails*, ispessimenti o versamenti pleurici anche di piccola entità, alveologrammi, broncogrammi aerei e aree di consolidamento polmonare (Babkine & Blond, 2009; Ollivett & Buczinski, 2016; Ghanem et al., 2016). In particolare, in caso di broncopolmonite si possono osservare aree non ventilate del polmone a causa dell'infiltrato cellulare e dei detriti che occupano gli alveoli, riducendo il contenuto d'aria del tessuto polmonare e cambiandone di conseguenza l'ecogenicità (Ollivett & Buczinski, 2016). È efficace anche nell'indagare le porzioni cranio-ventrali del polmone degli animali di giovane età, che radiograficamente sono più complesse da analizzare a causa della sovrapposizione tra campi polmonari, silhouette cardiaca, tessuti molli e ossei (Babkine & Blond, 2009). Il principale limite sta nel fatto che non esistono lesioni patognomiche di polmonite da

BRD: ad esempio, il consolidamento polmonare si può rinvenire anche in quadri di atelettasia da compressione o da ostruzione e non sempre la distinzione con quello da polmonite è semplice, soprattutto nel primo caso. Inoltre, il consolidamento potrebbe svilupparsi in una fase più tardiva della patogenesi della BRD, determinando una riduzione della specificità (Buczinski et al., 2014). Il vantaggio di questa metodica risiede nel fatto che ha una buona sensibilità (fino all'89%), tant'è che le aree di consolidamento possono essere presenti anche in animali asintomatici o che non vengono monitorati con sufficiente attenzione: meno del 50% dei vitelli con lesioni ecografiche evidenti presentavano una sintomatologia clinica tale da definirli malati (Buczinski et al., 2014; Berman et al., 2019). Associando l'ecografia ai sistemi di *score* clinico si può puntare ad aumentare la propria sensibilità diagnostica e identificare anche gli individui con possibile patologia subclinica. È anche possibile stabilire se le affezioni riguardano le vie aeree superiori o inferiori, dato che le prime presentano un quadro ecografico normale a livello polmonare in contrasto con uno *score* respiratorio positivo, mentre le seconde presentano un quadro ecografico alterato accompagnato o meno da alterazioni del quadro clinico (Buczinski et al., 2014; Ghanem et al., 2016).

La termografia a infrarossi è un metodo diagnostico non invasivo, che si basa sulla rilevazione della quantità di energia emessa sottoforma di radiazione infrarossa da un corpo e che permette di determinare la temperatura del corpo stesso, dato che maggiore è l'emissione di infrarossi e maggiore è la temperatura. Per rendere visibili gli infrarossi, la termocamera restituisce un termogramma, ovvero un'immagine in cui vengono associati diversi colori ai vari livelli di radiazione emessa (Lowe et al., 2019). È una metodica efficace nell'identificare la presenza di BRD negli animali nelle prime fasi della patologia, perché i cambiamenti della temperatura misurata a livello di canto mediale dell'occhio si manifestano fino a una settimana prima dell'inizio della sintomatologia clinica (Schaefer et al., 2004; Wolfger et al., 2015). Dunque, il principale vantaggio della termografia è che può consentire di iniziare precocemente il trattamento e le azioni di controllo della diffusione, come l'isolamento dell'animale dal resto della mandria (Schaefer et al., 2004, 2007). Tuttavia, l'ipertermia non è associata esclusivamente alla BRD, quindi è necessario confermare la diagnosi con altre metodiche (Wolfger et al., 2015). Inoltre, per ottenere risultati che siano validi è importante prepararsi correttamente, tenendo conto della temperatura esterna, della

distanza tra il soggetto e l'obiettivo e della diversa emissività degli animali, che dipende anche dall'esercizio e dalla foltezza del vello.

L'esame emocromocitometrico raramente è utile nella diagnosi di affezioni respiratorie nei ruminanti, data la grande variabilità di risposta e la scarsa accuratezza. Alcune infezioni virali possono causare leucopenia, mentre quando subentra una polmonite batterica si ha neutrofilia, eventualmente accompagnata da *shift* a sinistra e da aumentato rapporto tra neutrofili e linfociti; se la polmonite fosse cronica, la conta dei leucociti potrebbe risultare normale (Wolfger et al., 2015; Smith et al., 2019).

Per quanto riguarda l'esame biochimico, è possibile evidenziare l'alterazione delle proteine di fase acuta, tra cui aptoglobina (Hp), amiloide sierica A (SAA), fibrinogeno, *lipopolysaccharide binding protein* (LBP), proteina C-reattiva, transferrina e albumina (Wolfger et al., 2015; Buczinski & Pardon, 2020). Tuttavia, la risposta di fase acuta, che stimola il fegato a produrre le proteine di fase acuta, è legata all'aumento della cortisolemia, che può essere dovuto anche ad altri *stressors* (Krehbiel, 2020). Alcuni elementi e parametri sierici possono avere valore prognostico in termini di sopravvivenza dell'animale: ad esempio, lattatemia bassa e cortisolemia alta sono associati ad una maggiore mortalità, mentre glicemia alta 4 giorni dopo l'infezione virale è stata associata a una maggiore probabilità di sopravvivenza (Wolfger et al., 2015).

I test microbiologici per l'isolamento e l'identificazione dei patogeni associati alla BRD costituiscono un valido strumento per decidere le strategie di controllo e prevenzione della patologia, ma richiedono un'attenta interpretazione a causa della dubbia significatività del ritrovamento di alcuni patogeni (Pardon & Buczinski, 2020; Cummings et al., 2022). Si possono ottenere campioni sia dagli animali vivi che dalla carcassa di animali morti o soppressi; le principali tecniche di campionamento *in vivo* comprendono tamponi nasofaringei, lavaggio bronco-alveolare (BAL) con o senza endoscopia, aspirato trans-tracheale (TTA) e lavaggio trans-tracheale (TTW) con o senza endoscopia (Abutarbush et al., 2019; Smith et al., 2019; Pardon & Buczinski, 2020).

I tamponi nasali vengono effettuati campionando principalmente la porzione rostrale delle narici con un tampone di 13,5 cm, che viene successivamente riposto in un

terreno di trasporto. Per ottenere un campione diagnostico è buona prassi campionare gli animali che presentano segni di BRD e non sono ancora stati trattati e pulire la parte esterna delle narici con una garza prima di inserire il tampone (Smith et al., 2019; Pardon & Buczinski, 2020). Si possono impiegare anche tamponi nasofaringei, che possiedono una guaina esterna prevenire la contaminazione da parte dei batteri delle porzioni più esterne delle cavità nasali e sono più lunghi, permettendo di ottenere un campione più significativo dei microrganismi presenti nel nasofaringe (Smith et al., 2019; Pardon & Buczinski, 2020).

Le tecniche di TTW, TTA e BAL sono più dispendiose in termini di tempo e più complesse nella manualità rispetto ai tamponi nasofaringei, ma sono in grado di fornire campioni più diagnostici. Quindi, si tende a impiegarli quando si lavora sul singolo individuo, mentre per campionamenti di più animali si tende ad impiegare tamponi nasali e nasofaringei (Abutarbush et al., 2019; Smith et al., 2019). I campionamenti trans-tracheali si effettuano perforando la trachea tra due anelli tracheali contigui con un ago o un catetere in seguito alla preparazione chirurgica della cute a livello della regione ventrale del collo; dopodiché si può esclusivamente aspirare il muco presente nella trachea oppure immettendo e riaspirando circa 20 mL di soluzione fisiologica sterile e si aspira immediatamente, cercando di recuperare almeno 3-5 mL di liquido di lavaggio per le analisi successive (Abutarbush et al., 2019; Pardon & Buczinski, 2020). Infine, per l'esecuzione del BAL si introduce un catetere alla cieca o, meno frequentemente in campo, una sonda endoscopica flessibile attraverso le cavità nasali, la faringe e la trachea, fino ad arrivare nel lume di un bronco. A questo punto si immettono circa 60 mL di fisiologica sterile e si riaspira subito, ripetendo la procedura una o due volte se necessario (Pardon & Buczinski, 2020).

I campioni per la microbiologia possono anche essere raccolti durante la necropsia. L'identificazione di batteri patogeni dipende da numerosi fattori, tra cui eventuali trattamenti antimicrobici effettuati, grado di decomposizione della carcassa, modalità di raccolta, conservazione e trasporto dei campioni, tempo intercorso tra il campionamento e l'arrivo in laboratorio e sensibilità e specificità della metodica con cui si rilevano i batteri (Pancieria & Confer, 2010). Data la superficie estesa del polmone, è necessario raccogliere almeno 3-5 campioni multipli dai vari lobi con le lesioni più recenti per aumentare la capacità diagnostica. Foci di necrosi caseosa e di infiltrato

granulomatoso sono siti di campionamento ideali per la ricerca di *Mycoplasma bovis*, mentre gli ascessi non sono adatti da campionare per identificare i batteri patogeni primari (Caswell et al., 2012).

I campioni ottenuti dalle varie tecniche devono poi essere maneggiati e trasportati secondo le linee guida fornite dal laboratorio di riferimento per garantire la corretta esecuzione degli esami batteriologici, virologici e biomolecolari (Smith et al., 2019). I test colturali sono particolarmente importanti per l'identificazione dei batteri patogeni presenti e per la determinazione dell'antibiogramma. Alcuni microrganismi, come i micoplasmi e altri germi *fastidious*, necessitano di terreni di trasporto e coltura specifici per evitare di essere completamente occultati dalla sovracrescita della flora microbica residente e ambientale (Pardon & Buczinski, 2020). La *Polymerase Chain Reaction* (PCR) è un test biomolecolare che permette di identificare più microorganismi insieme in modo rapido, compresi batteri difficili da coltivare per tempi lunghi o necessità particolari. Tuttavia, identifica anche patogeni non vitali, batteri opportunisti non coinvolti nell'infezione e contaminanti, rendendo più complessa l'interpretazione dei risultati (Pardon & Buczinski, 2020).

È anche possibile valutare i titoli anticorpali sierici su prelievi di sangue venoso con diverse metodiche ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), in particolare per validare i programmi vaccinali o la qualità della colostratura ed effettuare indagini epidemiologiche (Pardon & Buczinski, 2020). I principali limiti sono legati al fatto che dà un'evidenza indiretta dell'avvenuta infezione e che per le prime 3 settimane post-infezione l'animale risulta negativo, dato che la sieroconversione non è ancora avvenuta (Pardon & Buczinski, 2020).

Anche l'esame necroscopico di animali morti di malattia o sottoposti a eutanasia può fornire informazioni utili per la prevenzione e la terapia. Infatti, alcune caratteristiche tipiche delle principali cause di broncopolmonite, se individuate, permettono di stilare una lista più accurata di diagnosi differenziali (Smith et al., 2019). Idealmente bisognerebbe raccogliere campioni di tessuti da diversi animali rappresentativi dell'espressione della patologia della mandria, in stadio precoce della malattia e non trattati. Ciò risulta difficilmente praticabile se è disponibile un numero esiguo di individui, perché nei pochi animali deceduti spesso si rinvengono lesioni

suggestive di affezioni batteriche e virali senza la possibilità di isolare il patogeno responsabile a causa della terapia subita o della risposta immunitaria (Caswell et al., 2012). È sconsigliato raccogliere campioni da animali con affezioni croniche o che non hanno risposto ai trattamenti, perché ciò potrebbe portare ad isolare ceppi batterici resistenti non rappresentativi degli effettivi agenti patogeni inizialmente coinvolti nella patogenesi della malattia. Per questo motivo sarebbe preferibile eseguire le necrosopie su animali in fase acuta di infezione (Gorden & Plummer, 2010). L'indagine necroscopica dovrebbe includere la valutazione delle prime vie respiratorie, della trachea e dei polmoni per la ricerca di essudati, lesioni necrotiche, aree di congestione o emorragia (Smith et al., 2019). All'ispezione del polmone, a seconda dell'agente patogeno coinvolto si può trovare un diverso pattern di polmonite batterica: broncopolmonite suppurativa o lobulare da *P. multocida*, polmonite fibrinosa o lobare da *M. haemolytica* e *H. somni* o infine broncopolmonite caseonecrotica o da micoplasmi (Panciera & Confer, 2010). Man mano che la broncopolmonite diventa cronica tendono a formarsi degli ascessi, che possono essere anche causati da *T. pyogenes* o batteri anaerobi (Panciera & Confer, 2010; Smith et al., 2019). Infine, alcuni virus, tra cui BRSV, possono causare una polmonite interstiziale, che talvolta si trova diffusa ai lobi più caudali associata ad una broncopolmonite dei lobi craniali (Panciera & Confer, 2010).

1.2.5 PREVENZIONE DELLA BRD NELLA VITELLAIA

La BRD rappresenta un importante problema per gli allevamenti di vacche da latte e c'è ancora margine di miglioramento nelle strategie di controllo e prevenzione di questa sindrome. L'obiettivo di un buon controllo è cercare di far sviluppare e mantenere ai vitelli un'immunità robusta per mezzo di una buona colostratura, un'alimentazione idonea, un programma di vaccinazione ottimale, l'adozione di efficaci misure di biosicurezza e la permanenza in strutture adatte, soprattutto in termini di ventilazione. Se in una stalla insorge un focolaio di BRD, è importante valutare attentamente il management, che influenza sia i fattori di rischio ambientali che quelli legati all'ospite, elencati nella tabella 5 (Gorden & Plummer, 2010).

Tabella 5: fattori associati allo sviluppo di patologie respiratorie nei vitelli da latte.

Fattori di rischio per l'aumento di morbilità delle patologie respiratorie	
Associati al vitello (individuali e gestionali)	Associati alla stalla
<ul style="list-style-type: none"> • Patologie concomitanti (diarrea) • Mancato trasferimento dell'immunità passiva: IgG totale sierica \leq 1200 mg/dL o proteine totali sieriche $<$ 5.7 g/dL • Alimentazione con colostro mastitico • Disinfezione dell'ombelico • Carenze nutrizionali • Stato vaccinale • Nascita in autunno/inverno • Genetica • Sesso • Chirurgie 	<ul style="list-style-type: none"> • Scarsa ventilazione o qualità dell'aria • Stabulazione a contatto con vacche • Lettieria inadeguata • Diarrea nei vitelli • Mandria di grandi dimensioni • Vitelli in recinti di gruppo pre-svezzamento • Range d'età nel box di gruppo ($>$ 8 settimane di differenza d'età tra i vitelli) • Sovraffollamento • Vitelli con madre $>$ 24h dalla nascita • Eccessiva variazione di temperatura • Controllo temperatura manuale (vs automatico) nella vitellaia • Mescolamento gruppi vs “<i>all-in, all-out</i>”
Fattori che riducono la morbilità delle patologie respiratorie	
Associati al vitello (individuali e gestionali)	Associati alla stalla
<ul style="list-style-type: none"> • Stabulazione individuale all'aperto • Supervisionare vitelli • IgG sieriche totali $>$ 800 mg/dL • Somministrazione prodotti per prevenzione diarrea 	<ul style="list-style-type: none"> • Bassa conta batterica totale in aria di recinti dei vitelli • Barriere fisiche tra vitelli in recinti individuali • <i>Nesting score</i> elevato

Fonte: Smith et al., 2019; Cummings et al., 2022.

La corretta vaccinazione contro patogeni virali e batterici è un'arma importante per la prevenzione della BRD, ma allo stesso tempo con l'aumentare delle dimensioni degli allevamenti industriali aumenta anche l'esposizione ai patogeni, rappresentando una sfida all'efficacia vaccinale. Inoltre, la grande diversità di ambienti e di management unita alla complessità del sistema immunitario dei vitelli rende pressoché impossibile creare un singolo protocollo vaccinale per tutti i settori produttivi dell'allevamento bovino e spinge verso la progettazione di programmi vaccinali più mirati, basati sulla valutazione del rischio per diversi patogeni nelle singole realtà (Gorden & Plummer, 2010; Smith et al., 2019). In particolare, la protezione

dall'infezione dipende dal livello di immunità passiva al momento della vaccinazione, dalla somiglianza tra il ceppo vaccinale e quello di campo e dal tempo intercorso tra la vaccinazione e l'esposizione al patogeno (Chamorro & Palomares, 2020).

Entro il mese d'età il sistema immunitario dei vitelli risulta sviluppato, ma alcuni meccanismi di difesa non sono ben funzionanti per i primi mesi di vita. Per questo motivo, nel caso in cui ci fosse un'alta probabilità che si verifichi un fallimento del trasferimento dell'immunità passiva nei vitelli di un allevamento, sarebbe bene eseguire le vaccinazioni dalle quattro settimane d'età per stimolare lo sviluppo di anticorpi protettivi. Invece, negli animali con un buon livello di immunità passiva protettiva si possono impiegare vaccini intranasali, che stimolano lo sviluppo dell'immunità mucosale e sistemica in modo più efficiente rispetto ai vaccini parenterali (Gorden & Plummer, 2010; Chamorro & Palomares, 2020).

Nella pianificazione dei programmi vaccinali è importante scegliere quelli più adatti alla realtà d'allevamento considerata, perché l'impiego di vaccini in modo eccessivo potrebbe portare a tolleranza immunologica o autoimmunità (Gorden & Plummer, 2010). Sul mercato esistono numerosi vaccini di tipo monovalente, bivalente, trivalente o tetravalente, inattivati o vivi attenuati, intranasali o parenterali, immunizzanti per BHV-1, BVDV, BRSV, PI-3V, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni* (Richeson & Falkner, 2020). Nessuno di questi vaccini è in grado di fornire una protezione completa a ogni individuo di ogni mandria, ma la somministrazione di diversi antigeni nella corretta tempistica è fondamentale per l'efficacia vaccinale. In particolare, è necessario del tempo per consentire lo sviluppo dell'immunità contro gli agenti causali della BRD, ma se la vaccinazione avviene durante una fase di stress o in contemporanea alla diffusione della malattia i risultati sono ben peggiori. Dunque, il miglior momento per vaccinare è quando gli animali sono in uno stato di omeostasi immunologica, senza compresenza di infezioni acute e alcune settimane prima rispetto a quando generalmente si potrebbero verificare focolai di BRD (Richeson & Falkner, 2020).

Una strategia vaccinale proposta è quella dell'uso dei vaccini intranasali per il BHV-1, il BRSV e il PI-3. Per i vaccini vivi attenuati somministrabili per via

parenterale è necessario aspettare i 2-3 mesi d'età per il BVDV, le 6 settimane per *Pasteurella* e i 2 mesi per i clostridi.

Se vengono individuati animali con patologia respiratoria, la scelta delle molecole da utilizzare deve basarsi sugli agenti eziologici isolati dal focolaio e sulla base delle precedenti esperienze nell'azienda (Smith et al., 2019).

1.2.6 IMPORTANZA ECONOMICA DELLA BRD

La BRD viene considerata una delle problematiche più significative di perdita economica per tutti i settori dell'allevamento bovino, compreso il settore delle vacche da latte, dal momento che si tratta di una delle principali cause di morbilità e mortalità nell'industria del bestiame (Gorden & Plummer, 2010; McGill & Sacco, 2020; Peel, 2020).

Nell'industria lattiera, la maggior parte dei problemi si riscontrano nella vitellaia, in cui si rilevano aumento della mortalità, BCS più basso e riduzione dell'accrescimento ponderale e del normale sviluppo del soggetto per l'intensa stimolazione del sistema immunitario (Hussein et al., 2018; Krehbiel, 2020). La polmonite batterica è seconda solo alle patologie enteriche come causa di malattia e perdite tra i vitelli in pre- e post-svezzamento (Panciera & Confer, 2010; Cummings et al., 2022). Generalmente, nelle linee vacca-vitello e negli allevamenti di vacche da latte l'incidenza clinica della BRD si manifesta soprattutto nei primi due mesi di vita (Berman et al., 2019).

Sebbene venga rilevata prevalentemente negli animali più giovani, anche gli adulti possono esserne colpiti, determinando una serie di effetti negativi a livello di prestazioni produttive dei capi in lattazione (ridotta produzione di latte; minor fertilità e fecondità; aumento di aborti, natimortalità e mortalità neonatale), oltre alla riduzione del benessere animale. Inoltre, le perdite economiche legate al danno che la BRD determina sui bovini (morbilità, mortalità, riforma involontaria) si sommano ai costi di vaccinazione e trattamento (Peel, 2020).

È importante considerare anche i costi non immediati, dovuti al fatto che la terapia non sempre è in grado di ripristinare la piena produttività delle vacche e

l'accrescimento ottimale dei vitelli: infatti, le manze a cui è stata diagnosticata la BRD da vitelle hanno un accrescimento giornaliero ridotto di 0,067 kg/d rispetto agli animali sani e producono in media 121,2 kg di latte in meno durante la prima lattazione (Peel, 2020; Buczinski et al., 2021). Inoltre, gli animali che si sono ammalati di BRD in giovane età hanno una probabilità 2,3 volte maggiore di essere riformate prima del primo parto e la mortalità è 2,85 volte più alta rispetto agli animali che non si sono ammalati (Buczinski et al., 2021).

Anche i fallimenti terapeutici sono una fonte importante di perdite per l'allevatore, oltre a favorire l'insorgenza di antimicrobico-resistenza nella mandria (Booker & Lubbers, 2020). Infatti, gli animali non necessariamente manifestano sintomatologia clinica e non sempre tutti i casi vengono correttamente diagnosticati, portando a non trattare animali che potrebbero sviluppare successivamente forme croniche, meno responsive alla terapia antimicrobica (Bassel et al., 2020; Booker & Lubbers, 2020). Inoltre, dato che la sintomatologia è aspecifica, talvolta la BRD non viene correttamente distinta da altre patologie, portando all'impiego di antibiotici anche in animali che non ne hanno bisogno (Booker & Lubbers, 2020). Questo inconveniente può essere evitato investendo sulla prevenzione e sulle vaccinazioni, soprattutto in caso di allevamenti in cui si osservano alte prevalenze di BRD (Dubrovsky et al., 2020).

Tabella 6: conseguenze della BRD che diventano causa di perdita economica negli allevamenti di bovine da latte.

Effetti negativi sulla vitellaia	Effetti negativi sulla mandria	Costi non immediati
<ul style="list-style-type: none"> • Mortalità • Ridotto peso allo svezzamento • Costi di trattamento • Costi di vaccinazione 	<ul style="list-style-type: none"> • Mortalità • Peggioramento indici produttivi • Peggioramento indici riproduttivi • Costi di trattamento • Costi di vaccinazione • Insorgenza di antimicrobico-resistenza 	<ul style="list-style-type: none"> • Indici produttivi non completamente ripristinati • Accrescimento ridotto vitelli

Fonte: Peel, 2020.

1.3 APPLICAZIONE DELL'ECOGRAFIA ALLA DIAGNOSI DI PATOLOGIE RESPIRATORIE

L'ecografia è una tecnica di imaging che genera immagini dei tessuti a seconda di come si propagano attraverso di loro gli ultrasuoni, ovvero onde sonore di frequenza superiore a quelle normalmente percepite dall'orecchio umano (2-10 MHz). Le prime applicazioni dell'ecografia in buiatria erano soprattutto legate all'ambito ginecologico, ma lo sviluppo di strumenti più precisi e maneggevoli ne ha favorito l'impiego anche per la diagnosi di disturbi non legati alla sfera riproduttiva (Streeter & Step, 2007; Blond & Buczinski, 2009).

In ambito buiatico, le sonde più usate sono di tipo lineare o convex con una frequenza di 3,5-8 MHz; le sonde per le ecografie transrettali possono essere impiegate anche nell'ecografia toracica di giovani vitelli, perché facilitano l'accesso alla regione ascellare e toracica craniale, coperte dalla spalla (Streeter & Step, 2007; Babkine & Blond, 2009; Blond & Buczinski, 2009; Ollivett & Buczinski, 2016).

Per gestire i vitelli è consigliabile contenerli nel modo meno invasivo possibile, soprattutto se gli animali sono molto giovani, perché spesso l'agitazione causata dal contenimento può prolungare il tempo impiegato a effettuare le manualità: può essere sufficiente anche un operatore che blocchi il posteriore in un angolo e che tenga una mano sotto la testa, estendendo leggermente il collo (Ollivett & Buczinski, 2016).

È importante effettuare le ecografie con un approccio sistematico, visualizzando i polmoni in senso caudo-craniale e dorso-ventrale, seguendo il profilo delle coste e mantenendo la sonda parallela ad esse lungo tutta la lunghezza degli spazi intercostali e leggermente inclinata caudalmente per evitare di ecografare il tessuto osseo (Ollivett & Buczinski, 2016). La finestra acustica per la visualizzazione di pleure e polmoni è delimitata dai limiti polmonari craniale e caudale, dorsalmente dalla linea superiore del Vogel, parallela al terreno e passante per i processi trasversi delle vertebre toraciche, e ventralmente dalla linea inferiore del Vogel, parallela al terreno e intersecante l'articolazione del gomito. Negli animali giovani, i campi polmonari si estendono dal primo al decimo spazio intercostale a destra e dal secondo al decimo a sinistra, con gran parte delle lesioni localizzate cranialmente al sesto spazio intercostale. Il lobo caudale si visualizza dal decimo al sesto spazio ed è delimitato ventralmente dal diaframma e dal

fegato, il lobo medio destro si trova a livello di quinto spazio ed è delimitato dall'interfaccia pleurica e infine il lobo craniale è visibile dal quarto al primo spazio a destra e dal quinto al secondo a sinistra. Negli animali con età inferiore a sei mesi le masse muscolari non sono ancora ben sviluppate; quindi, la componente craniale dei lobi polmonari craniali è osservabile a livello di primo e secondo spazio intercostale a destra e secondo e terzo a sinistra. Nonostante questo, rimane un'area comunque complessa da visualizzare (Ollivett & Buczinski, 2016).

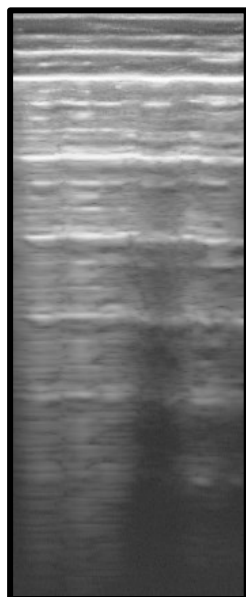
Tabella 7: punti di repere e riferimenti ecografici per effettuare correttamente ecografie polmonari nei vitelli.

Riferimenti per l'ecografia del polmone destro				
Lobo polmonare				
	Caudale	Medio	Porzione caudale del craniale	Porzione craniale del craniale
Spazi intercostali	6-10	5	3-4	1-2
Limiti ventrali	Diaframma	Giunzione costocondrale e pleura	Cuore	Arteria e vena toracica interna
Riferimenti per l'ecografia del polmone sinistro				
Lobo polmonare				
	Caudale		Porzione caudale del craniale	Porzione craniale del craniale
Spazi intercostali	6-10		4-5	2-3
Limiti ventrali	Diaframma		Giunzione costocondrale e pleura	Cuore

Fonte: Ollivett & Buczinski, 2016.

In un soggetto sano, la pleura parietale e la pleura viscerale formano una linea iperecogena che scorre in modo sincrono con la respirazione (*gliding sign*). Inoltre, data la presenza di aria nel parenchima polmonare, gli echi vengono riflessi tra gas e sonda, generando artefatti di riverbero che formano le linee A e rendendo impossibile visualizzare il tessuto polmonare (Blond & Buczinski, 2009; Ollivett & Buczinski, 2016).

Figura 1: immagine ecografica di polmone sano. La linea iperecogena dorsale è l'interfaccia tra le pleure parietale e viscerale. Sotto di essa si possono osservare gli artefatti di riverbero generati dal gas, rappresentati da una serie di linee ecogene, parallele e orizzontali (linee A) che si approfondano nel parenchima.



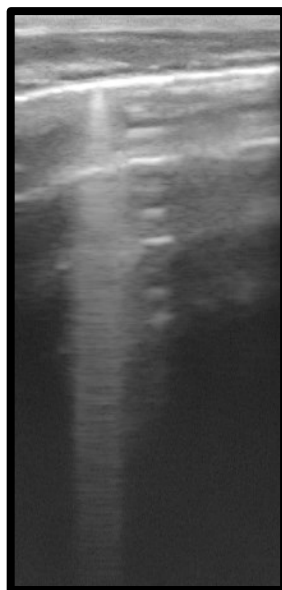
Fonte: U.I. Ruminanti – Università degli Studi di Padova, Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD)

Le principali lesioni osservabili per via ecografica a livello pleurico sono versamenti, ispessimenti o irregolarità della parete pleurica e pneumotorace. Un versamento pleurico è una raccolta di fluido tra la pleura parietale e quella viscerale, che può avere origine da patologie della pleura stessa o da affezioni dei tessuti circostanti. All'ecografia si osserva come una raccolta di liquido anecogeno o ipoecogeno (a seconda della cellularità) nello spazio compreso tra il polmone e la parete toracica, accumulandosi generalmente nelle zone più declivi del torace o nei pressi di altre lesioni polmonari. Quando il versamento è associato a quadri infiammatori (pleuriti e pleuropolmoniti), generalmente è dato da essudato ricco di cellule infiammatorie, detriti cellulari e frustoli di fibrina evidenziabili come particelle ecogene in movimento nel fluido anecogeno. Per conoscere l'esatta natura del versamento è necessario eseguire l'analisi del liquido prelevato per toracocentesi. Questa manovra può essere eseguita per via eco-guidata non soltanto a scopo diagnostico e di monitoraggio, ma anche per effettuare un drenaggio del versamento pleurico per dare sollievo al paziente (Babkine & Blond, 2009; Tharwat & Oikawa, 2011). Il normale aspetto ecografico della pleura

dovrebbe essere quello di una linea ecogena omogenea e sottile, ma in presenza di pleurite fibrinosa o polmonite suppurativa cronica si possono evidenziare discontinuità o ispessimenti (Babkine & Blond, 2009). Inoltre, se il *gliding sign* non è più visibile, potrebbe essere causato da aderenze che limitano il movimento dei foglietti pleurici o da pneumotorace. La presenza di *comet tails* generalmente esclude la presenza di pneumotorace in quel punto (Streeter & Step, 2007).

Le alterazioni del parenchima polmonare sono evidenziabili come attenuazioni dell'artefatto di riverbero. È importante considerare che con l'ecografia si possono osservare solo le lesioni prossime alla pleura viscerale (Babkine & Blond, 2009). Il reperto più frequente è il *comet tail artefact* (CTA), causato da piccoli accumuli subpleurici di fluido (sangue, muco, edema, essudato), detriti cellulari o cellule tumorali. Possono ritrovarsi occasionalmente in soggetti sani, ma se sono numerose e di dimensioni importanti diventano un indicatore aspecifico della presenza di pneumopatie di varia natura (polmonite virale o batterica, edema polmonare, polmonite interstiziale) o di fibrosi causata da precedenti processi patologici (Babkine & Blond, 2009; Streeter & Step, 2007). Le lesioni di natura infiammatoria più gravi spesso si osservano nelle aree più craniali e ventrali del polmone ed interessano maggiormente i lobi craniali e il medio destro (Tharwat & Oikawa, 2011; Ollivett & Buczinski, 2016).

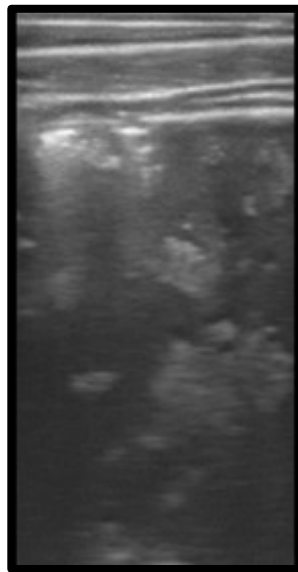
Figura 2: immagine ecografica di comet tail.



Fonte: U.I. Ruminanti – Università degli Studi di Padova, Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD)

Un'altra lesione evidenziabile con l'ecografia è il consolidamento polmonare, ovvero la riduzione del contenuto d'aria all'interno del parenchima polmonare che può essere associato a polmonite, infarto o atelettasia (Buczinski et al., 2014). Appare inizialmente come un insieme di aree ipoecogene per la presenza di liquido o l'aumento della cellularità, localizzate spesso a livello cranio-ventrale (Streeter & Step, 2007; Tharwat & Oikawa, 2011). Man mano che il processo patologico prosegue, la quantità di aria nel tessuto si riduce e possono apparire broncogrammi aerei, che si presentano come piccoli spot iperecogeni con CTA sottostanti. Infine, quando il consolidamento diventa molto grave il parenchima assume lo stesso aspetto ecografico del fegato, tant'è che si parla di epatizzazione polmonare; si tratta di una delle lesioni più frequenti durante le patologie respiratorie in bovini e ovini (Streeter & Step, 2007; Babkine & Blond, 2009; Tharwat & Oikawa, 2011). A questo punto anche l'aria che era nei bronchi viene sostituita da fluidi e/o detriti cellulari, che sono visibili come aree tondeggianti anecogene circondate da una parete iperecogena e con CTA sottostante, definite alveologrammi aerei (Streeter & Step, 2007; Babkine & Blond, 2009).

Figura 3: immagine ecografica di epatizzazione polmonare.



Fonte: U.I. Ruminanti – Università degli Studi di Padova, Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD)

Dagli anni '90 è aumentato il numero degli studi volti alla determinazione dell'accuratezza nell'individuazione delle lesioni polmonari in vitelli da latte (Ollivett & Buczinski, 2016). Il primo studio ad aver indagato l'accuratezza dell'ecografia

toracica ha documentato le lesioni visualizzate tra il dodicesimo ed il terzo ICS utilizzando una sonda settoriale a 7.5 MHz in 18 vitelli di Frisona con meno di 5 mesi d'età, classificando le lesioni sulla base della profondità e del pattern ecografico e confrontandole con i reperti evidenziati all'esame istopatologico (Ollivett & Buczinski, 2016). Tra le varie lesioni che possono essere osservate all'ecografia toracica in animali affetti da BRD, la profondità del consolidamento polmonare è ciò che è stato associato con maggiore certezza alla manifestazione clinica di BRD, oltre ad avere una buona correlazione con l'estensione del consolidamento (Ollivett & Buczinski, 2016; Berman et al., 2019). Nel 2015 è stata effettuata un'analisi bayesiana per stimare specificità e sensibilità dell'ecografia in vitelli di frisona in età pre-svezzamento, impiegando una sonda lineare da 6.2 MHz, scansionando dall'undicesimo al terzo ICS e considerando affetti da BRD gli animali con almeno 1 cm di consolidamento polmonare (Buczinski et al., 2015). Un terzo studio effettuato su 24 animali clinicamente sani per cercare lesioni polmonari subcliniche ha presentato una sensibilità del 94% ed una specificità del 100%, sottolineando che le uniche lesioni osservabili con l'ecografia sono superficiali (Ollivett & Buczinski, 2016). Altri studi hanno studiato la correlazione tra quanto osservato tramite ecografia toracica ed esame anatomopatologico, evidenziando una buona concordanza tra le due metodiche nell'individuazione della distribuzione del consolidamento polmonare (Ollivett & Buczinski, 2016).

Misurare le lesioni nella realtà di campo può risultare dispendioso in termini di tempo, quindi il sistema di *scoring* proposto da Ollivett e Buczinski nel 2016 si basa sulla classificazione delle lesioni con sei diversi punteggi, compresi tra 0 e 5: 0 e 1 sono considerati normali, mentre > 3 sono coerenti con la presenza di una broncopolmonite batterica (Ollivett & Buczinski, 2016). Le lesioni impiegate nell'attribuzione dei punteggi sono diffuso ispessimento pleurico, che è caratterizzato da artefatti di *comet-tails*, aree di consolidamento lobulare, caratterizzate da ipoecogenicità diffusa con estensione limitata all'interno di parenchima polmonare ventilato, e di consolidamento lobare, che coinvolge invece l'intero spessore di parenchima visualizzabile ecograficamente (Ollivett & Buczinski, 2016). La classificazione viene fatta sulla base della presenza di CTA, epatizzazioni o alveologrammi e i punteggi vengono attribuiti come indicato nella tabella 8 (Ollivett & Buczinski, 2016).

Tabella 8: scoring system di Olivett e Buczinski.

PUNTEGGIO	ASPETTO ECOGRAFICO	CLASSIFICAZIONE
0	Parenchima aerato, pleura normale, no consolidamento, nessuno o pochi CTA	Polmone sano
1	CTA diffusi senza consolidamento	Polmone sano
2	Consolidamenti lobulari focali, multifocali o disseminati di ridotte dimensioni	Polmonite lobulare
3	Consolidamento 1 lobo	Polmonite lobare
4	Consolidamento 2 lobi (porzioni craniale e caudale di lobo craniale trattati distintamente)	Polmonite lobare
5	Consolidamento ≥ 3 lobi	Polmonite lobare

Fonte: Olivett & Buczinski, 2016.

È stata anche indagata la variazione di sensibilità e specificità dell'ecografia con diversi *cut-off* della profondità del consolidamento per considerarlo significativo e distinguerlo da altre lesioni, quali ispessimento pleurico o altre patologie della pleura (Berman et al., 2019). Per quanto riguarda la profondità del consolidamento, la sensibilità si attesta intorno ad 89% non risulta variare particolarmente, ma una soglia ≥ 3 cm di profondità determina un aumento della specificità, che arriva fino a 95%, rispetto ad una soglia di 0 cm e ≥ 1 cm (Berman et al., 2019).

Recentemente è stato elaborato anche un metodo di *scoring* ecografico che prende in considerazione le diverse lesioni ecografiche polmonari osservabili (*comet-tails*, epatizzazioni e alveogrammi), con lo scopo di distinguere tra le diverse tipologie di consolidamento polmonare e definire con maggior precisione lo stato di salute di polmoni (Fiore et al., 2022). Ad ogni area in cui divisi i polmoni, ovvero craniale, media e caudale, è stato attribuito un punteggio da 0 a 7 sulla base delle lesioni riscontrate; dopodiché, è stata calcolata la somma dei punti ottenuti nelle varie aree, ossia il *global lesion score* (GS), compreso tra 0 e 42 (Fiore et al., 2022).

1.3.1 VANTAGGI E SVANTAGGI DELL'ECOGRAFIA

In ambito buiatrico, l'ecografia ha iniziato ad essere impiegata dagli anni '80 per la valutazione del tratto riproduttivo e la diagnosi di gravidanza, data la possibilità di

ottenere diagnosi in modo rapido, preciso ed economico (DesCôteaux et al., 2009; Buczinski & O'Connor, 2016).

Rispetto alla radiologia fornisce una migliore risoluzione e permette di analizzare sezioni di organi da diverse finestre e in tempo reale, senza il rischio di esposizione alle radiazioni per l'operatore e per il paziente (Blond & Buczinski, 2009; Buczinski & Pardon, 2020). La dispersione di parte di energia degli ultrasuoni sottoforma di calore è di breve durata ed intensità, tanto da non produrre alcuna alterazione misurabile di temperatura (Herring & Bjornton, 1985; Shriki, 2014). La maneggevolezza e i costi relativamente bassi delle apparecchiature hanno favorito il suo impiego anche in altri campi oltre alla riproduzione, come per la diagnosi di disordini gastroenterici, respiratori, epatici, muscolo-scheletrici, cardiovascolari, del tratto genito-urinario (Buczinski & O'Connor, 2016; Streeter & Step, 2007).

L'ecografia permette di discernere masse cistiche da solide (e di analizzare l'architettura tissutale di queste ultime), visualizzare l'interno di cavità corporee piene di fluidi, individuare la presenza di calcoli non radiopachi, valutare lesioni muscolo-tendinee e cardiache, effettuare diagnosi di gravidanza (Cartee et al., 1993). È anche un ausilio nella raccolta di campioni a scopo diagnostico, come centesi o biopsie, come ad esempio campioni biotipici ecoguidati di masse, centesi e aspirazione di ascessi, colecistocentesi, cistocentesi (Cartee et al., 1993; Braun, 2009). Infine, è un utile metodo di valutazione del follow-up, della risposta alle terapie e della prognosi di animali con patologie in atto (Hussein et al., 2018).

Anche il contenimento dell'animale nella maggior parte dei casi è minimo, soprattutto quando si ha a che fare con vitelli in giovane età, per evitare che gli animali si stressino e si agitano eccessivamente, rendendo la procedura più lunga e difficile. Con i vitelli molto giovani a volte è sufficiente spingere il posteriore in un angolo e tenere la testa sollevata (Ollivett & Buczinski, 2016). Invece, nelle bovine da latte, nei vitelloni e negli animali adulti il contenimento fisico in cattura o travaglio è difficilmente evitabile, perché permette all'operatore di operare in sicurezza (Ollivett & Buczinski, 2016).

Anche la preparazione del paziente è relativamente veloce e necessita di pochi strumenti: in campo la maggior parte delle ecografie viene eseguita senza tricotomia

della parte e impiegando alcol isopropilico per consentire una buona trasmissione degli ultrasuoni (Ollivett & Buczinski, 2016).

Nonostante tutti questi aspetti positivi, nell'ecografia la tecnica, l'esperienza e l'approccio dell'operatore alla macchina ed è fondamentale conoscere le basi dell'interazione tra ultrasuoni e tessuti molli, ossa ed aria e l'utilizzo dei comandi dell'ecografo per poter eseguire ed interpretare correttamente le immagini ecografiche (Herring & Bjornton, 1985).

Inoltre, l'ecografia presenta dei limiti fisici, legati all'interazione degli ultrasuoni con l'organismo: è una tecnica ottima per visualizzare i tessuti molli, ma in presenza di substrati fortemente riflettenti (aria, tessuto osseo) non è possibile analizzare le strutture sottostanti in modo soddisfacente; inoltre, l'attenuazione dell'energia degli echi non consente di analizzare strutture poste troppo in profondità (Streeter & Step, 2007). Dato che gli ultrasuoni non sono in grado di attraversare tessuto polmonare areato, questo potrebbe nascondere eventuali lesioni poste nelle aree più profonde del parenchima polmonare; dato che la maggior parte delle lesioni polmonari associate alla BRD si sviluppano a partire dalle pleure, non dovrebbe creare eccessivi problemi nella diagnosi di questa patologia (Ollivett et al., 2015).

In ogni caso, i numerosi aspetti positivi di questa tecnica di *imaging* a fronte dei pochi svantaggi hanno favorito il suo sviluppo e la sua diffusione in ambito buiatrico (Streeter & Step, 2007).

2. OBIETTIVI

Il seguente progetto di tesi ha avuto lo scopo di approfondire la diagnosi e la prevenzione del complesso della sindrome respiratoria bovina (*Bovine Respiratory Disease Complex* - BRDC) nei vitelli da latte. Questa patologia ha un forte impatto economico in termini di perdite produttive, mortalità e costi per le terapie e coinvolge in modo trasversale le diverse tipologie di allevamenti bovini.

Per questo motivo si è cercato di focalizzare l'attenzione sulla prevenzione di questa patologia nei vitelli da latte tramite l'impiego di diversi tipi di profilassi vaccinale e sull'utilizzo del monitoraggio ecografico delle lesioni polmonari come strumento di diagnosi precoce.

Partendo da tali premesse, gli obiettivi che si è posto questo studio sono stati valutare l'efficacia di diversi protocolli vaccinali nella gestione della BRD nella vitellaia degli allevamenti di vacche da latte, valutare l'utilizzo dell'ecografia polmonare come strumento di monitoraggio e di diagnosi della BRD nei vitelli in età pre-svezzamento e individuare le possibili differenze tra le diverse vie di somministrazione dei protocolli vaccinali, ovvero intranasale, parenterale o entrambe le vie.

Tale studio potrebbe configurarsi come un valido aiuto per il medico veterinario aziendale, perché punta a fornire una migliore identificazione delle patologie polmonari nel vitello da latte e a studiare la validità della profilassi vaccinale, con lo scopo di migliorare la gestione dello stato di salute e di benessere dei vitelli da parte dell'allevatore. Anche l'allevatore stesso potrebbe quindi beneficiare della riduzione delle perdite economiche legate ai costi diretti e indiretti della BRD.

3. MATERIALI E METODI

La raccolta dei dati è stata effettuata da ottobre 2021 a marzo 2022 presso quattro aziende di vacche da latte situate in Veneto (Italia). Tutte le procedure effettuate rispettano quanto prescritto dalla direttiva 2010/63/CE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.

Sono stati reclutati 201 vitelli di razza Frisona nati con parto eutocico. Dopo il parto, i vitelli hanno ricevuto una corretta colostratura, secondo i dettami delle normative vigenti, e sono stati trasferiti in gabbie individuali sopraelevate, di dimensioni 0,9 x 1,8 x 1,8 m e situate all'aperto.

Foto 1: esempio di vitellaia di uno degli allevamenti coinvolti nello studio, costituita da gabbie individuali rialzate poste al fuori dalle strutture dedicate alle vacche e alle manze.



Fonte: U.I. Ruminanti – Università degli Studi di Padova, Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD)

I vitelli sono stati sottoposti a tre diversi protocolli vaccinali in tre aziende, mentre una ha ospitato il gruppo di controllo negativo di animali non vaccinati:

- Gruppo A, o gruppo di controllo, composto da 41 individui che non hanno ricevuto vaccinazione;

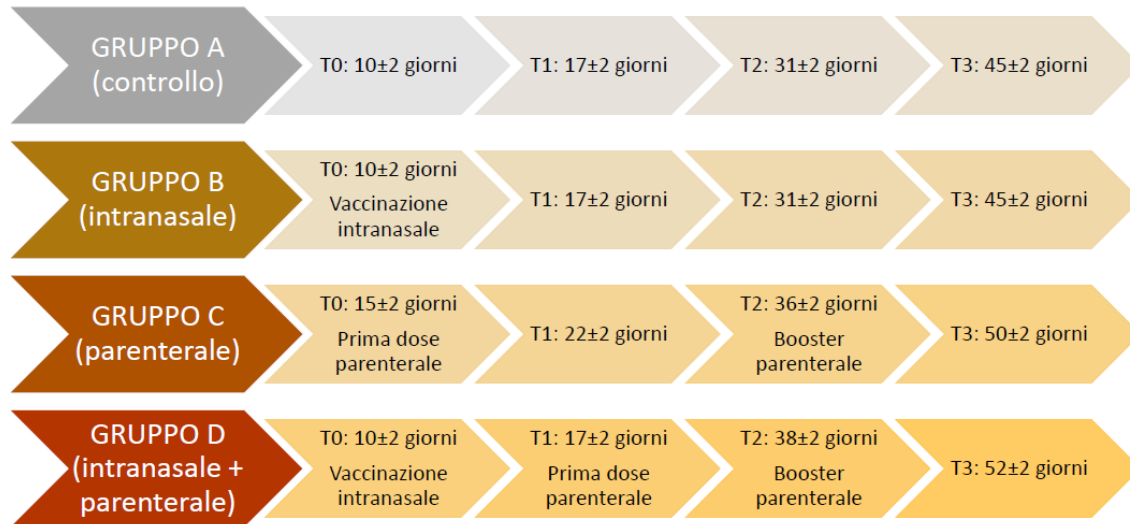
- Gruppo B, in cui sono stati inseriti 46 vitelli sottoposti a vaccinazione intranasale (Bovalto® Respi Intranasal; Boehringer Ingelheim Animal Health Italia S.p.A., Noventa Padovana, Italia) contro PI3 e BRSV;
- Gruppo C, con 52 animali che hanno ricevuto un vaccino parenterale (Bovalto® Respi 3; Boehringer Ingelheim Animal Health Italia S.p.A., Noventa Padovana, Italia) per PI3, BRSV e *M. haemolytica*;
- Gruppo D, comprendente 62 animali vaccinati con intranasale e parenterale contro PI3, BRSV e *M. haemolytica*.

L'efficacia dei vaccini è stata valutata attraverso la raccolta di dati relativi a *score* clinico ed ecografico, valutati in quattro momenti diversi per ciascun vitello, permettendo di monitorare l'evoluzione della sintomatologia tipica della BRD e di definire l'andamento della BRD negli animali sottoposti e non al protocollo vaccinale. È stata eseguita la valutazione clinica ed ecografica nel giorno del reclutamento (T0), ovvero all'età di 10 ± 2 giorni per i vitelli appartenenti ai gruppi A, B e D e di 15 ± 2 giorni per il gruppo C. Dopo questa prima valutazione, i gruppi B e D hanno ricevuto la prima dose del vaccino intranasale, mentre il gruppo C ha ricevuto la prima dose di vaccino parenterale. Una settimana dopo il T0 (T1) è stata eseguita la seconda valutazione clinica ed ecografica, dopo la quale agli animali del gruppo D hanno ricevuto la prima dose di vaccino parenterale. Il terzo esame clinico ed ecografico è stato svolto due settimane dopo il T1 per gli animali dei gruppi A, B e C e tre settimane dopo il T1 per gli animali del gruppo D. Infine, l'ultimo controllo (T3) è stato effettuato due settimane dopo il T2.

Prima della somministrazione del vaccino o del richiamo, è stato eseguito un tampone nasale sui soggetti identificati come affetti da BRD alla visita clinica per definire la condizione epidemiologica della stalla. Il tampone è stato poi spedito per le analisi presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, con sede a Legnaro (PD).

Gli animali reclutati non hanno ricevuto terapie antibiotiche per malattia respiratoria durante l'effettuazione della prova.

Figura 4: schema riassuntivo delle tempistiche con cui è stata svolta la raccolta dei dati nei vitelli di ogni gruppo. Ad ogni tempo sono stati eseguiti esame clinico ed ecografico, mentre i tamponi nasali sono stati raccolti solo negli animali ritenuti malati.



3.1 VALUTAZIONE CLINICA

La valutazione clinica ha incluso esame obiettivo generale, esame obiettivo particolare dell'apparato respiratorio e impiego di uno score clinico per standardizzare i reperti clinici individuati ad ogni visita per ciascun animale. A ciascun vitello è stato assegnato un *Respiratory Score* (RS) basato su quattro parametri tratti dal Wisconsin *scoring system* descritto da McGuirk & Peek (2014), ovvero scolo nasale, scolo oculare e delle orecchie, tosse e temperatura rettale. Ciascun segno clinico ha ricevuto un punteggio in base all'intensità della manifestazione clinica, compreso tra 0, che indica l'assenza di quel segno, e 3, che viene associato ad una grave alterazione. Gli animali sono stati considerati malati se hanno ottenuto un punteggio ≥ 4 nella somma dei punteggi ottenuti dai vari parametri, oppure se è stato assegnato un valore ≥ 2 almeno a due segni clinici. Sulla base del numero di vitelli risultati malati allo score respiratorio è stata calcolata la percentuale di vitelli affetti clinicamente da BRD (SRS%).

La tabella 9 riassume i significati dei vari punteggi, mentre la tabella 10 è la scheda impiegata per la raccolta dello score clinico durante la prova.

Tabella 9: segni clinici impiegati nello scoring system e definizione dei punteggi assegnati.

Segno clinico	Punteggi e descrizione			
	0	1	2	3
Temperatura rettale (°C)	37.8-38.3	38,4-38,8	38,9-39,4	> 39,4
Tosse	Assente	Inducibile	Occasionale spontanea, ripetuta se indotta	Ripetuta spontanea
Scolo nasale	Normale, sieroso	Monolaterale, torbido	Bilaterale mucoso	Bilaterale, abbondante, mucopurulento
Scolo oculare e delle orecchie	Assente	Scolo oculare di media entità o orecchie leggermente abbassate	Scolo oculare bilaterale o orecchio basso unilaterale	Scolo oculare bilaterale o orecchie abbondante o orecchie abbassate

Fonte: McGuirk & Peek (2014).

Tabella 10: scheda dati con i parametri impiegati per lo scoring clinico.

SCHEDA DATI:	Allevamento: _____	Data: ___/___/___		
ID ANIMALE: _____	N. Aziendale: _____	Peso: _____		
Età: _____				
Vaccino eseguito: _____				
	T0	T1	T2	T3
Score clinico				
Scolo nasale				
Scolo oculare e delle orecchie				
Tosse				
Temperatura rettale				
<i>Complessivo</i>				
Note: scolo nasale = 0 (assente), 1 (monolaterale), 2 (bilaterale mucoso), 3 (bilaterale abbondante o purulento); scolo oculare e delle orecchie = 0 (assente e posizione normale), 1 (scolo medio o orecchie leggermente abbassate), 2 (scolo moderato o orecchio basso unilaterale), 3 (scolo abbondante o orecchie abbassate); Tosse = 0 (assente), 1 (inducibile), 2 (occasionale spontanea), 3 (spontanea ripetuta); temperatura rettale = 0 (37.8-38.3), 1 (38.4-38.8), 2 (38.9-39.4), 3 (>39.4).				

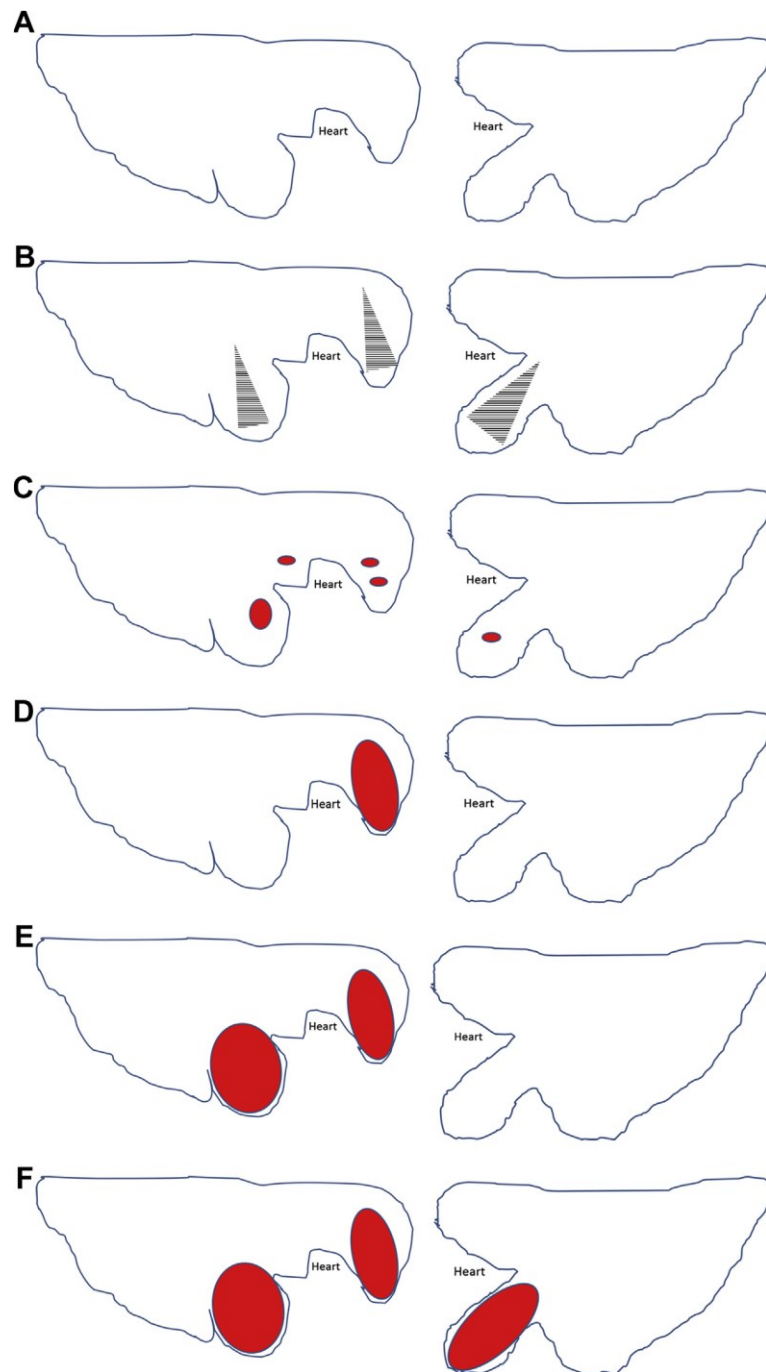
3.2 VALUTAZIONE ECOGRAFICA

La valutazione ecografica è stata eseguita con un ecografo portatile Draminski Blue (Draminski® S.A., Olsztyn, Polonia) associato ad una sonda lineare multifrequenza (Lineare L40/10 MHz, 6.0-15.0 MHz; Draminski® S.A., Olsztyn, Polonia). Le scansioni sono state effettuate mantenendo i vitelli all'interno delle loro gabbie. È stato impiegato alcol etilico (90%) per migliorare il contatto tra la cute e la sonda senza l'impiego della tricotomia.

La scansione ecografica dei polmoni è stata eseguita bilateralmente e ciascun polmone è stato suddiviso in tre aree da ecografare, ovvero caudale (10°-7° spazio intercostale), media (6°-5° spazio intercostale) e craniale (4°-1° spazio intercostale). La sonda è stata spostata lungo gli spazi intercostali in direzione dorso-ventrale, mantenendola leggermente inclinata caudalmente per poter visualizzare con più facilità i polmoni. Le scansioni sono state eseguite mantenendo un settaggio costante con frequenza di 6.0 MHz, 15 cm di profondità della finestra acustica, 100% di gain e compensazione *time-gain* in posizione neutrale. Le immagini sono state salvate in formato DICOM (*digital imaging and communications in medicine*) per le analisi successive.

Durante l'esecuzione dell'esame ecografico è stata effettuata una valutazione basandosi su una scala di punteggio compresa tra 0 e 5, secondo il sistema di *scoring* proposto da Ollivett e Buczinski, rappresentato nella figura 5: 0 indica assenza di lesioni e visualizzazione di parenchima areato; 1 è associato a presenza di numerosi *comet-tail artifacts* in assenza di consolidamento; 2 si ha quando si osserva consolidamento lobulare; 3 indica consolidamento lobare; 4 significa che si ha consolidamento lobare in due lobi; 5 indica consolidamento lobare di tre o più lobi (Ollivett & Buczinski, 2016). Va specificato che in questo contesto i termini "lobare" e "lobulare" non sono associati alla suddivisione anatomica in lobi del polmone, ma indicano piuttosto l'estensione delle lesioni: una lesione lobulare è un'area ristretta di consolidamento compresa in parenchima aerato, mentre una lesione lobare è un'area di consolidamento a tutto spessore (Ollivett & Buczinski, 2016).

Figura 5: scoring system (0-5) per stabilire la gravità delle lesioni nei vitelli. Il punteggio 0 (A) equivale all'assenza di lesioni; 1 punto (B) indica la presenza di numerose comet-tail in assenza di consolidamento; un punteggio pari a 2 (C) è associato alla presenza di consolidamento lobulare; la presenza di consolidamento lobare è associata ad un punteggio pari a 3 (D) se coinvolge un solo lobo polmonare, 4 (E) se coinvolge 2 lobi e 5 (F) se coinvolge 3 o più lobi. Un punteggio ≥ 3 è associabile alla presenza di una broncopolmonite batterica.



Fonte: Ollivett & Buczinski, 2016.

Gli animali che ottengono un grado 0 o 1 vengono classificati come sani, mentre un grado 3 è compatibile con la presenza di broncopolmonite batterica (Ollivett & Buczinski, 2016). Questo metodo di classificazione non prende in considerazione lesioni quali pneumotorace, versamento pleurico, ascessi o necrosi (Ollivett & Buczinski, 2016). Inoltre, questo *score* classifica epatizzazioni e alveologrammi come consolidamento polmonare senza distinzione tra i due tipi di lesione. La tabella 11 mostra la scheda impiegata per la raccolta dei dati in campo per un T di un vitello.

Basandosi sullo score ecografico è stata anche calcolata la percentuale di animali malati (SUS%), dato impiegato successivamente per le analisi statistiche.

Tabella 11: scheda impiegata per la valutazione ecografica dei vitelli durante la prova. In ogni T di ogni animale sono state segnate le lesioni rinvenute per ciascuna area del polmone (craniale, medio, caudale).

Data:

Polmone Sinistro	Caudale (7-10 ICS)	Medio (6-5 ICS)	Craniale (4-1 ICS)	Polmone Destro	Caudale (7-10 ICS)	Medio (6-5 ICS)	Craniale (4-1 ICS)
Dorsale				Dorsale			
Media				Media			
Ventrale				Ventrale			

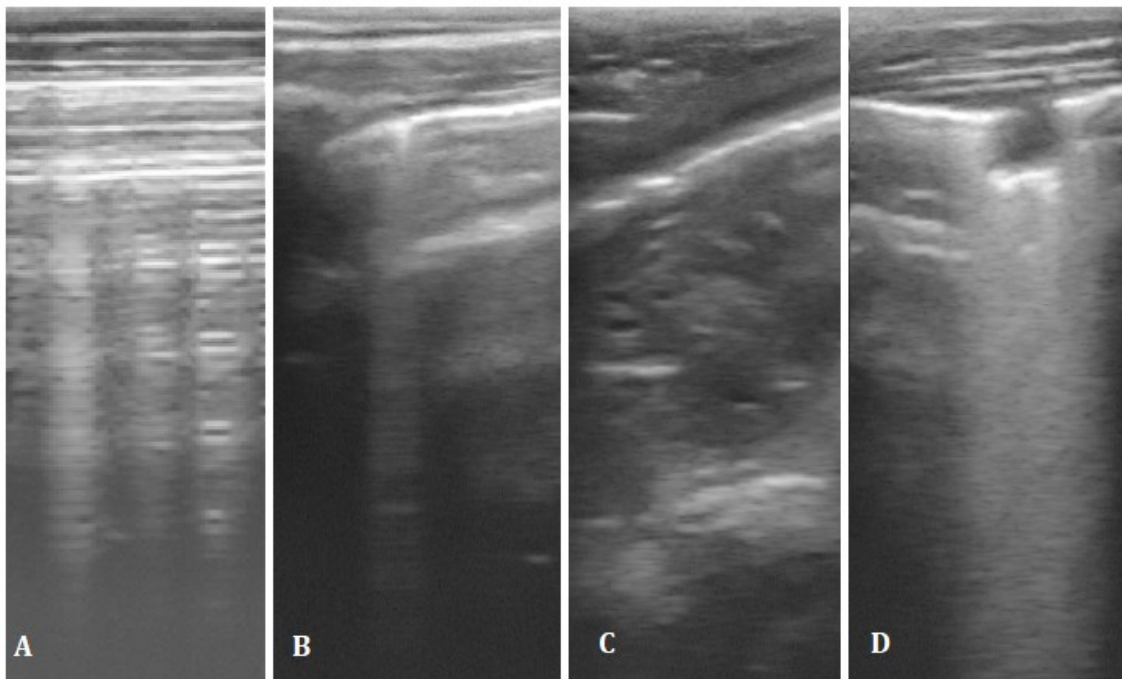
Note: 0 = assenti aree di consolidamento; 1 = *comet-tail* senza aree di consolidamento; 2 = area/e di consolidamento lobulare; 3 = area di consolidamento lobare, 1 lobo; 4 = aree di consolidamento lobare, 2 lobi; 5 = aree di consolidamento lobare, 3 o più lobi.

Dal momento che lo *score* elaborato da Ollivett e Buczinski prende in considerazione il consolidamento polmonare senza distinguere tra alveologrammi ed epatizzazione, a questo è stato affiancato il *global lesion score*. Questo metodo associa un punteggio compreso tra 0 e 7, come indicato nella tabella 12, diverse tipologie di lesione polmonare, presentate nella figura 6. La somma del punteggio ottenuto da ciascuna delle aree craniale, media e caudale dei polmoni sinistro e destro è stata definita come *score* globale (GS), il cui valore è compreso tra 0 e 40; 10.5 è stato individuato come *cut-off* per definire se l'animale è sano o malato (Fiore et al., 2022).

Tabella 12: punteggio associato a ciascun tipo di lesione polmonare. La somma di tutti i punteggi ottenuti dai lobi craniale, medio e caudale dei polmoni determina lo score globale.

Lesione	Punteggio
Assenti	0
<i>Comet-tail</i>	1
Epatizzazione	2
<i>Comet-tail</i> + epatizzazione	3
Alveogrammi fluidi	4
<i>Comet-tail</i> + alveogrammi fluidi	5
Epatizzazione + alveogrammi fluidi	6
<i>Comet-tail</i> + epatizzazione + alveogrammi fluidi	7

Figura 6: area di polmone normalmente areato (A) e vari tipi di lesioni: l'immagine B presenta una *comet-tail*, nella foto C si osserva un'area di epatizzazione polmonare e infine nella D si osserva un alveogramma fluido.



Fonte: U.I. Ruminanti – Università degli Studi di Padova, Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD)

3.3 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata impiegando il software R ver. 4.2.0, integrato con il pacchetto "rcmdr" (R Core Team, Vienna, Austria). Dal momento che al test di normalità Shapiro-Wilk la distribuzione dei dati è risultata non normale, sono stati effettuati i test di Kruskal-Wallis e di Dunn per evidenziare eventuali differenze significative tra i 4 gruppi nei singoli tempi e per singolo gruppo nei 4 tempi.

È stata calcolata la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) per stabilire il valore soglia di GS con punteggio di *score* ecografico ≥ 3 e ottenere così il *cut-off* per stabilire se un animale è sano o malato.

È stato impiegato il software MedCalc software per Windows ver.19.4 (MedCalc Software, Ostend, Belgio) per effettuare il test del Chi-quadro e l'*odds ratio*. In particolare, il primo è stato impiegato per la valutazione delle differenze tra gruppi e nel tempo delle percentuali di animali malati o deceduti, mentre il secondo è stato utilizzato per valutare la probabilità di BRD diagnosticata con l'utilizzo dello *score* ecografico in base ai diversi protocolli vaccinali.

Il *p-value* accettato per i vari test è stato sempre inferiore o uguale a 0,05.

4. RISULTATI

I risultati degli esami batteriologici e virologici svolti sugli animali malati hanno rilevato la presenza di alcuni dei tipici patogeni della BRD, tra cui *Mannheimia haemolytica*, rilevata nel gruppo A per tutta la durata dello studio e nel gruppo B alla fine del periodo di prova, *Pasteurella multocida* a fine prova nel gruppo B e nella prima metà dello studio nel gruppo C e infine Coronavirus in due vitelli del gruppo D a fine studio.

Successivamente sono state confrontate le medie dei valori di *scores* clinico ed ecografico, GS e temperatura rettale dei vari gruppi tra loro e nei vari T, riportate nella tabella 13.

Non è stata osservata alcuna differenza significativa nello *score* ecografico dei gruppi al momento del reclutamento (T0), mentre in T1 e T2 nel gruppo A sono stati rilevati valori maggiori rispetto agli altri gruppi e in T3 il gruppo C e il gruppo D sono stati associati a valori più bassi rispetto al controllo. Anche l'andamento dei valori di *score* è diverso tra i gruppi: il gruppo di controllo ha subito un peggioramento nel tempo, mentre è stato rilevato un miglioramento negli altri tre, il gruppo B a T1 e i gruppi C e D a T2.

Per quanto riguarda lo *score* clinico, il gruppo che ha presentato i valori medi maggiori è stato il C, che però è stato superato dai gruppi B e D in T3. Il gruppo D è stato anche l'unico il cui andamento dei punteggi ha subito un costante peggioramento nel tempo.

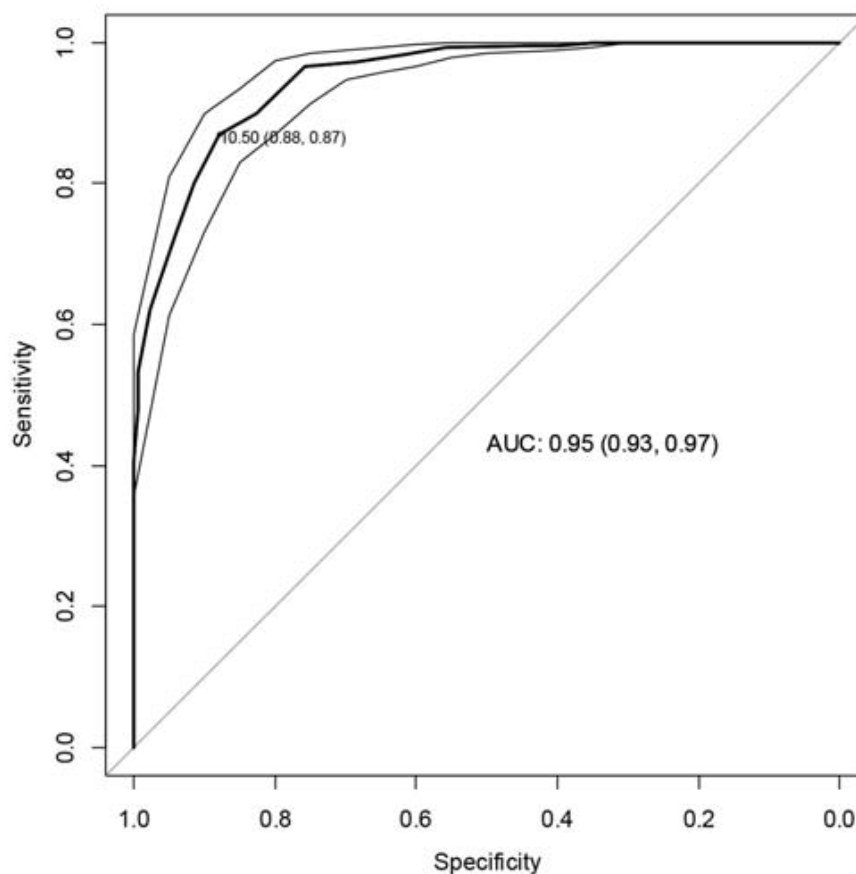
Il GS più alto in T0 è stato rilevato sempre nel gruppo C, seguito dai gruppi A, D e B. Il valore di GS del gruppo A è peggiorato progressivamente fino a T3, quando è stato nuovamente superato dal gruppo C, che era migliorato in T1 e T2 per peggiorare nuovamente. Il gruppo B ha subito un miglioramento in T1, mentre il gruppo D in T2.

Tabella 13: la tabella presenta gli scores ecografico e clinico, temperatura rettale e score globale delle lesioni polmonari (GS) nei vari gruppi e tempi, espressi come media e con errore standard (standard error of mean – SEM). NS: non significativo; ^{a-c}: valori medi con differenza significativa sulla stessa riga; ^{x-z}: valori medi con differenza significativa sulla stessa colonna.

Score ecografico	Gruppo A (n=34)	Gruppo B (n=29)	Gruppo C (n=26)	Gruppo D (n=46)	SEM	<i>p-values</i>
T0 (10-15 giorni)	2.22 ^y	1.97 ^y	2.42 ^x	1.97 ^x	0.22	NS
T1 (17-22 giorni)	3.97 ^{a,x}	1.17 ^{c,z}	2.40 ^{b,xy}	1.82 ^{b,xy}	0.23	< 0.01
T2 (31-38 giorni)	3.60 ^{a,xy}	1.41 ^{b,yz}	1.91 ^{b,y}	1.52 ^{b,y}	0.26	< 0.01
T3 (45-52 giorni)	3.64 ^{a,xy}	2.27 ^{ab,x}	2.11 ^{b,xy}	1.81 ^{b,xy}	0.27	< 0.05
SEM	0.26	0.22	0.26	0.24	/	/
<i>p-values</i>	< 0.05	< 0.01	< 0.05	< 0.05	/	/
Score clinico	Gruppo A (n=34)	Gruppo B (n=29)	Gruppo C (n=26)	Gruppo D (n=46)	SEM	<i>p-values</i>
T0 (10-15 giorni)	0.96 ^b	1.77 ^{ab}	2.26 ^a	1.41 ^{b,y}	0.23	0.01
T1 (17-22 giorni)	1.16 ^b	1.29 ^{ab}	1.89 ^a	1.81 ^{a,xy}	0.25	< 0.01
T2 (31-38 giorni)	0.97 ^b	1.63 ^{ab}	1.92 ^a	1.79 ^{ab,xy}	0.27	< 0.01
T3 (45-52 giorni)	1.20 ^b	2.14 ^a	1.62 ^b	2.22 ^{a,x}	0.28	< 0.05
SEM	0.27	0.23	0.27	0.26	/	/
<i>p-values</i>	NS	NS	NS	< 0.05	/	/
Temperatura rettale	Gruppo A (n=34)	Gruppo B (n=29)	Gruppo C (n=26)	Gruppo D (n=46)	SEM	<i>p-values</i>
T0 (10-15 giorni)	38.54	38.72	38.84	38.65	0.09	NS
T1 (17-22 giorni)	38.63	38.67	38.83	38.94	0.10	NS
T2 (31-38 giorni)	38.50	38.79	38.79	38.74	0.11	NS
T3 (45-52 giorni)	38.38	38.67	38.72	38.89	0.12	NS
SEM	0.11	0.09	0.11	0.10	/	/
<i>p-values</i>	NS	NS	NS	NS	/	/
GS	Gruppo A (n=34)	Gruppo B (n=29)	Gruppo C (n=26)	Gruppo D (n=46)	SEM	<i>p-values</i>
T0 (10-15 giorni)	8.60 ^{b,y}	6.13 ^{c,y}	12.30 ^{a,x}	6.50 ^{c,y}	1.22	< 0.01
T1 (17-22 giorni)	13.99 ^{a,x}	5.04 ^{c,z}	10.96 ^{b,y}	5.94 ^{c,yz}	1.39	< 0.05
T2 (31-38 giorni)	11.71 ^{a,x}	6.27 ^{b,y}	10.11 ^{a,y}	5.33 ^{b,z}	1.53	< 0.01
T3 (45-52 giorni)	11.96 ^{a,x}	10.10 ^{ab,x}	12.06 ^{a,x}	8.06 ^{c,x}	1.61	< 0.05
SEM	1.54	1.31	1.52	1.38	/	/
<i>p-values</i>	< 0.05	< 0.01	< 0.05	< 0.05	/	/

L'analisi ROC ha individuato un valore soglia di GS di 10.50. L'area sotto la curva (AUC) risultante è stata 0.95 (intervallo di confidenza del 95%: 0.93-0.97; Sensibilità: 0.87; Specificità: 0.88), dimostrando che il potere diagnostico del test è eccellente.

Figura 7: curva Receiver Operating Characteristic (ROC) del global lesion score (GL) impiegando un punteggio di score ecografico ≥ 3 . L'area sotto la curva (AUC) indica il potere diagnostico del test: se è compresa tra 0.5 e 0.6 il test è fallimentare, tra 0.6 e 0.7 ha uno scarso potere diagnostico, tra 0.7 e 0.8 è discreto, tra 0.8 e 0.9 è buono e infine tra 0.9 e 1.0 è eccellente. In questo caso, il valore risultante è 0.95, indicando che il test ha un eccellente potere diagnostico.



Prendendo in considerazione la percentuale di animali considerati malati sulla base dello *score* clinico (SRS%) ed ecografico (SUS%), presentata nella tabella 14, l'unica differenza significativa di SRS tra i gruppi è stata rilevata al T0, con A e C che hanno il maggior numero di malati, seguiti dal gruppo B e D. Invece, il SUS ha presentato differenze significative tra i gruppi in T1, T2 e T3, ma non in T0. Inoltre, il gruppo A è stato caratterizzato da un aumento progressivo della percentuale di individui

risultanti malati, fino ad avere più di 2/3 di malati in T3. Il gruppo di controllo ha anche presentato la prevalenza maggiore rispetto agli altri gruppi, seguito in ordine decrescente da C, B e D in T1 e T2 e B, C e D in T3, con il gruppo B caratterizzato da più di 2/3 degli individui malati in T3. Anche la mortalità è stata rilevata come più alta nel gruppo A.

Tabella 14: la tabella presenta la percentuale di animali risultanti malati basandosi sullo score clinico (SRS%) ed ecografico (SUS%) e di morti nei vari gruppi e lungo tutta la durata dello studio. NS: non significativo; ^{a-c}: valori medi con differenza significativa sulla stessa riga; ^{x-z}: valori medi con differenza significativa sulla stessa colonna.

SRS%	Gruppo A (n=34)	Gruppo B (n=29)	Gruppo C (n=26)	Gruppo D (n=46)	<i>p-values</i>
T0 (10-15 giorni)	10.00	6.52 ^b	11.54 ^a	0.00 ^{c,y}	< 0.05
T1 (17-22 giorni)	5.03	2.33	4.17	0.00 ^y	NS
T2 (31-38 giorni)	4.50	0.00	4.16	0.00 ^y	NS
T3 (45-52 giorni)	5.21	4.00	4.56	8.52 ^x	NS
<i>p-values</i>	NS	NS	NS	< 0.05	/
SUS%	Gruppo A (n=34)	Gruppo B (n=29)	Gruppo C (n=26)	Gruppo D (n=46)	<i>p-values</i>
T0 (10-15 giorni)	47.06 ^y	34.78 ^y	46.15	30.14 ^x	NS ³
T1 (17-22 giorni)	56.00 ^{a,xy}	30.23 ^{b,y}	45.83 ^a	15.86 ^{c,y}	< 0.01
T2 (31-38 giorni)	55.56 ^{a,xy}	35.48 ^{b,y}	41.67 ^a	18.52 ^{c,y}	< 0.01
T3 (45-52 giorni)	68.75 ^{a,x}	68.00 ^{a,x}	45.46 ^b	28.15 ^{c,x}	< 0.01
<i>p-values</i>	< 0.05	< 0.01	NS	< 0.05	/
% animali morti	Gruppo A (n=34)	Gruppo B (n=29)	Gruppo C (n=26)	Gruppo D (n=46)	<i>p-values</i>
T0-T3	32.25 ^a	6.52 ^b	5.55 ^b	6.89 ^b	< 0.01

Per quanto riguarda l'*odds ratio* (tabella 15), non sono state rilevate differenze significative tra i gruppi in T0, ma tutti i gruppi di animali vaccinati hanno mostrato una minore prevalenza di animali risultanti malati secondo lo *score* ecografico in T1 e T2. Il gruppo D ha manifestato una minore percentuale di animali malati secondo lo *score* ecografico in T1 e T2 ed è anche l'unico gruppo ad aver ridotto la probabilità di avere vitelli malati in confronto a tutti gli altri in T3.

Tabella 15: la tabella presenta i valori di Odds Ratio ottenuti per ogni T tra i gruppi sottoposti a diversi tipi di vaccinazione e il gruppo di controllo (A). Se il valore di Odds Ratio è < 1 indica una minore probabilità che l'evento si manifesti, ovvero che i vitelli risultino affetti da BRD dallo score ecografico, in presenza dell'esposizione; se l'Odds Ratio è > 1 implica che l'esposizione aumenta la probabilità che l'evento si manifesti; infine, quanto l'Odds Ratio è pari a 1 significa che l'esposizione non influenza le probabilità dell'evento.

Tempo	Gruppo esposto	Gruppo non esposto	Odds Ratio	p-values
T0	B	A	0.60	NS
	C	A	0.96	NS
	D	A	0.36	NS
	C	B	1.61	NS
	D	B	0.60	NS
	D	C	0.37	NS
T1	B	A	0.34	< 0.01
	C	A	0.67	< 0.05
	D	A	0.17	< 0.01
	C	B	1.95	NS
	D	B	0.50	NS
	D	C	0.26	< 0.01
T2	B	A	0.44	< 0.05
	C	A	0.57	< 0.05
	D	A	0.18	< 0.01
	C	B	1.30	NS
	D	B	0.41	< 0.05
	D	C	0.32	< 0.01
T3	B	A	0.97	NS
	C	A	0.38	NS
	D	A	0.42	< 0.05
	C	B	0.39	NS
	D	B	0.44	< 0.05
	D	C	0.41	< 0.05

5. DISCUSSIONE

La BRD rimane un problema tutt'ora da risolvere, perché inficia il benessere e la salute dei vitelli e delle vacche da latte, aumenta la mortalità, soprattutto nella vitellaia, e diminuisce la produttività, risultando in una serie di costi diretti e indiretti per l'allevatore (Gorden & Plummer, 2010).

L'insorgenza della BRD dipende da numerose interazioni tra ospite, ambiente e patogeni che predispongono i vitelli ad avere una risposta immunitaria meno efficiente: patologie concomitanti, disidratazione, genetica, carenze o squilibri nutrizionali, procedure chirurgiche, fattori ambientali stressanti (scarsa ventilazione, cattiva qualità della lettiera, sovraffollamento, condizioni climatiche avverse, trasporto) sono tutti fattori predisponenti allo sviluppo di BRD (Cummings et al., 2022).

Nonostante la complessità dello sviluppo di programmi vaccinali per i vitelli, la vaccinazione è uno strumento efficace per ridurre l'incidenza della BRD, soprattutto per la prevenzione nei confronti dei patogeni virali (Gorden & Plummer, 2010; Chase, 2022). Le vie di somministrazione più comunemente impiegate sono la via parenterale e quella intranasale (Chamorro & Palomares, 2020). Il principale vantaggio della via intranasale è lo sviluppo precoce dell'immunità mucosale locale, senza interferenze con l'immunità materna, che consente di mantenere l'efficacia anche in vitelli con meno di una settimana di età (Chamorro & Palomares, 2020; Chase, 2022). Invece, i vaccini somministrati per via parenterale determinano lo sviluppo di una risposta immunitaria più tardiva a causa dell'interferenza con l'immunità passiva, ma consentono lo sviluppo sia dell'immunità umorale che di quella cellulo-mediata (Chamorro & Palomares, 2020).

Lo scopo di questo studio è stato valutare l'efficacia di diversi protocolli vaccinali per la prevenzione della BRD tramite *scoring* clinico ed ecografico, individuando possibili differenze tra l'impiego di vaccini somministrati per via parenterale, intranasale o entrambe.

Ciascun animale è stato valutato clinicamente tramite un *respiratory score*, che assegna un punteggio sulla base della presenza e della gravità di scolo nasale, scolo oculare e posizione delle orecchie, tosse e temperatura rettale, partendo dai parametri

proposti dalla Wisconsin *scoring chart*. Tuttavia, questo tipo di valutazione è caratterizzato da sensibilità e specificità abbastanza ridotte (rispettivamente 62% e 74%), per varie ragioni: alcuni animali possono risultare resistenti all'infezione per immunizzazione pregressa, oppure vitelli infetti possono eliminare i microrganismi patogeni senza sviluppare uno stato pro-infiammatorio grave, perché si trovano in uno stadio cronico della patologia o perché l'osservatore non è riuscito a individuare i segni clinici di BRD (Buczinski et al., 2015; Abutarbush et al., 2019; Bassel et al., 2020). Inoltre, i segni clinici considerati sono aspecifici e comuni ad altre sindromi, come ad esempio patologie gastrointestinali o setticemia (Buczinski et al., 2015; Cummings et al., 2022). Difatti, lo *score* clinico non ha presentato differenze significative nel tempo negli animali appartenenti al gruppo di controllo e sottoposti alle vaccinazioni intranasale e parenterale, mentre è stato possibile osservare una differenza significativa tra T0 e T3 all'interno del gruppo D, comprendente i vitelli sottoposti a vaccinazione sia parenterale che intranasale. Inoltre, il gruppo D è anche l'unico gruppo in cui si può osservare un mancato aumento della percentuale di animali risultati malati allo *scoring* respiratorio fino al T3, probabilmente riconducibile all'introduzione nella mandria del Coronavirus, contro cui gli animali non erano vaccinati. Le differenze tra le medie del punteggio dello *score* clinico tra i gruppi hanno manifestato un valore maggiore, sebbene tendente a calare, negli animali appartenenti al gruppo sottoposto a sola vaccinazione parenterale (gruppo C) fino a T3, quando è stato superato dai gruppi B (intranasale) e D; questa differenza al T3 potrebbe essere legata all'ingresso rispettivamente di *Pasteurella multocida* e Coronavirus nei due gruppi. Questi risultati potrebbero anche essere dovuti alla scarsa efficacia dello *score* respiratorio nell'identificazione degli animali malati.

Nonostante l'unico parametro compreso nello *scoring system* considerato oggettivo e indipendente dall'operatore sia la temperatura rettale (Maier et al., 2019), se si prende in considerazione esclusivamente media delle temperature rettali misurate tra i vari gruppi e tra i vari tempi, non sono risultate differenze significative. Questo può essere spiegato con il fatto che l'ipertermia derivante dalla BRD ha una durata limitata e che, per effettuare la misurazione, c'è la necessità di avvicinare e contenere i vitelli, che può essere un'importante fonte di stress e che quindi può essere responsabile di un temporaneo incremento di temperatura corporea (Abutarbush et al., 2012; Maier et al., 2019).

Dati i limiti presentati dall'impiego esclusivamente di *scores* clinici, rappresentati principalmente dalla loro ridotta sensibilità e specificità, è stata associata anche la valutazione tramite ecografia toracica, caratterizzata da una sensibilità dell'89% e una specificità del 95% (Berman et al., 2019). Infatti, rispetto al solo *score* clinico presenta una maggiore specificità e sensibilità; in particolare, la percentuale di animali malati rilevati con lo *score* ecografico è maggiore rispetto a quella dello *score* clinico, lasciando intendere che quest'ultimo abbia una maggiore quantità di falsi negativi. Questa maggiore accuratezza associata all'esame ecografico potrebbe essere legata al fatto che il consolidamento polmonare può essere osservato anche in animali con un andamento subclinico della patologia o prima che presentino i segni clinici (Buczinski et al., 2014).

Purtroppo, anche l'ecografia toracica non è esente limiti, dettati dal fatto che il consolidamento polmonare può non essere presente in casi precoci di BRD o in animali affetti da polmonite virale, che risultano falsi negativi, e può essere rilevato anche in casi cronici, che vengono classificati come falsi positivi (Buczinski et al., 2018). Inoltre, si possono osservare le lesioni solo se sono abbastanza superficiali e vicine alle pleure (Ollivett & Buczinski, 2016).

Quindi, un altro obiettivo di questo studio è stato valutare l'impiego di *scores* ecografici per la diagnosi e il monitoraggio della BRD in vitelli da latte. La valutazione ecografica è stata eseguita bilateralmente, visualizzando tutti i lobi polmonari, dal caudale al craniale, e spostando la sonda in direzione dorso-ventrale, mantenendo un approccio più sistematico possibile per cercare di individuare tutte le aree di consolidamento polmonare. Generalmente la broncopolmonite tende a localizzarsi nella porzione craniale del lobo craniale del polmone destro, soprattutto nelle prime fasi, seguito dal lobo medio del polmone destro e dalla porzione caudale del lobo craniale sinistro (Ollivett & Buczinski, 2016).

Per quanto riguarda lo *score* ecografico, gli animali sono stati considerati malati se hanno presentato un punteggio uguale o superiore a 3. Al T0 è stato già possibile osservare la presenza di consolidamento in alcuni vitelli, tanto che le medie dei punteggi si aggirano tra 1.97 e 2.42, senza differenze significative tra i vari gruppi. Il consolidamento individuato in questi animali difficilmente può essere associato a

patologie croniche, data la giovane età degli animali (10-15 giorni), ma può essere dovuto a lesioni causate da patogeni di origine batterica o virale. Infatti, la percentuale di animali considerati malati tramite l'impiego di *score* ecografico in T0 ha evidenziato tra il 30% e il 47% circa di animali malati (%SUS), sempre senza differenze significative tra i vari gruppi.

Durante T1-T2-T3 si è osservata una differenza significativa tra i punteggi ottenuti tra i gruppi sottoposti a vaccinazione e il gruppo di controllo (A), che ha presentato un peggioramento durante tutto il corso della prova. Al T1 i gruppi sottoposti a protocollo vaccinale hanno dimostrato un miglioramento dello *score* ecografico e, per i gruppi sottoposti a vaccinazione doppia o intranasale, del %SUS rispetto al gruppo di controllo. Questo risultato pare suggerire che la vaccinazione inizi a manifestare l'effetto protettivo già dopo una settimana dalla somministrazione, come sembra confermato anche dai valori di *odds ratio*, che confermano un minor rischio di sviluppare lesioni polmonari in tutti i gruppi sottoposti a vaccinazione. È da notare anche che il valore di *odds ratio* dimostra comunque che gli animali sottoposti a sola vaccinazione parenterale abbiano un maggior rischio di sviluppare lesioni polmonari rispetto a quelli sottoposti sia a vaccinazione parenterale che a quella intranasale. Dunque, questo studio conferma che la via di vaccinazione intranasale e quella parenterale sono altrettanto protettive a T1, ma l'immunità mucosale sviluppata dalla prima risulta più proteggente, almeno nel breve periodo.

I risultati ottenuti al T2 in termini di *score* ecografico, %SUS e *odds ratio* sono simili a quelli ottenuti al T1, sebbene anche l'*odds ratio* tra il gruppo degli animali con doppia vaccinazione (D) e quello degli animali con sola vaccinazione intranasale (B) abbia indicato che gli animali del gruppo D hanno un minor rischio di contrarre la BRD. Questo risultato potrebbe essere spiegato dallo sviluppo sia dell'immunità mucosale che di quella parenterale negli animali sottoposti a doppia vaccinazione, comportando una protezione maggiore dall'infezione dei patogeni tipici della BRD.

Come l'esame clinico, anche con quello ecografico ha rilevato in T3 un improvviso peggioramento della media degli *scores* ecografici e della %SUS nel gruppo sottoposto a vaccinazione parenterale (C) e intranasale (B), contrario alla tendenza al miglioramento evidenti da T0 a T2. In particolare, nel gruppo B la media degli *scores* è

passata da 1.41 in T2 a 2.27 in T3, di concerto con la %SUS raddoppiata in T3 rispetto al T2. Anche l'*odds ratio* non presenta differenze significative tra il gruppo A e il gruppo B, indicando che la probabilità che i vitelli sottoposti a vaccinazione intranasale si ammalino è pari a quella che si ammalino i vitelli del gruppo di controllo. Questo peggioramento probabilmente è imputabile all'ingresso nella mandria di *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida* a fine periodo di prova, contro cui i vitelli non erano stati immunizzati. Anche il gruppo D ha subito un peggioramento del punteggio medio dello *score* ecografico e della %SUS a causa dell'ingresso nella mandria del Coronavirus, ma questo non ha comunque influito sull'*odds ratio* rispetto a tutti gli altri gruppi, dimostrando che la doppia via di vaccinazione è stata più efficace nella prevenzione della BRD a 45-52 giorni d'età. La migliore performance ottenuta dalla doppia vaccinazione rispetto alla sola vaccinazione parenterale potrebbe essere legata all'immunità ad ampio spettro o alla diffusione di *Pasteurella multocida* nel gruppo C. In ogni caso il gruppo C, seppur avendo subito un aumento del punteggio medio di *score* ecografico e di %SUS rispetto a T2 a causa della diffusione di *Pasteurella multocida* tra i vitelli, non ha superato i valori che aveva in T0, evidenziando comunque un miglioramento rispetto all'inizio della prova in termini di lesioni polmonari rilevate. Questo risultato potrebbe essere dovuto al fatto che una singola dose di vaccino per via parenterale non fornisce una protezione sufficiente a prevenire l'insorgenza di BRD in vitelli di età compresa tra 2 e 5 settimane (Windeyer et al., 2012).

La durata dell'immunità sviluppata con la vaccinazione intranasale può durare fino a 21 settimane dopo la somministrazione, mentre la vaccinazione parenterale può fornire protezione anche per oltre 4 mesi (Peters et al., 2004). Dunque, il peggioramento delle lesioni polmonari evidenziate dallo *score* ecografico è probabilmente dovuto all'ingresso nei gruppi di *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida*, contro cui gli animali non erano immunizzati. Nonostante ciò, i gruppi sottoposti a vaccinazione hanno ottenuto una minore mortalità rispetto al gruppo di controllo, oltre ad aver manifestato una tendente riduzione del %SUS nel tempo (gruppi B e D) o una situazione costante ma comunque con %SUS minore rispetto al controllo (gruppo C). Questo risultato conferma che l'impiego della vaccinazione nella prevenzione della BRD è efficace nei vitelli da latte.

Il *global lesion score* (GS) è un metodo di valutazione ecografica proposto recentemente per distinguere tra le diverse lesioni polmonari, assegnando a ciascuna di esse un punteggio. La somma dei punti ottenuti in ciascun lobo di ciascun polmone restituisce un punteggio compreso tra 0 e 42, con 10.5 come valore soglia per distinguere gli animali malati dagli animali sani.

La prima differenza con lo *score* ecografico di Ollivett e Buczinski si osserva in T0, dato che i gruppi presentano una differenza significativa tra i punteggi. In particolare, il gruppo C, sottoposto a vaccinazione parenterale, risulta avere una media di punteggi più alta rispetto agli altri tre ed è caratterizzato dalla presenza di animali malati già a inizio prova. L'andamento dei gruppi B e D nel tempo sembra ricalcare quello che è stato evidenziato dallo *score* ecografico, con un miglioramento del punteggio medio nel gruppo sottoposto a vaccinazione intranasale fino a T2, mentre quello degli animali vaccinati sia per via parenterale che intranasale ha presentato una riduzione del punteggio medio fino a T3. Anche il gruppo di controllo è caratterizzato da un peggioramento evidente in T1 seguito da un lieve miglioramento in T2 e T3, in cui comunque la media dei punteggi superava il *cut-off* individuato tra animali sani e malati. Invece, il gruppo C è risultato malato oltre che in T0 anche in T1 e T3, pur migliorando il suo punteggio da T0 a T1, a differenza di quanto di quanto rilevato dallo *score* ecografico.

Sebbene l'estensione del consolidamento nei vitelli non sia stata associata ad un aumento dell'età al primo parto o della mortalità, la produzione di latte è risultata inferiore negli animali che hanno presentato lesioni polmonari di maggior entità ed estensione nei primi 56 giorni di vita (Dunn et al., 2018). Dati i risvolti pratici e viste le differenze presentate tra i punteggi dello *score* ecografico e del GS, sarebbe interessante effettuare ulteriori studi sul GS per migliorare la definizione dello stato di salute a livello polmonare.

6. CONCLUSIONE

In questo studio, l'ecografia polmonare è stata in grado di identificare gli animali malati con una sensibilità ed una specificità maggiori rispetto alla visita clinica, così com'è stato evidenziato anche da altri studi. Infatti, il numero di animali considerati malati con la visita clinica è decisamente inferiore rispetto al numero di vitelli che hanno presentato lesioni a livello polmonare. Dunque, il sistema di *scoring* clinico impiegato non si è dimostrato altrettanto accurato nella rilevazione degli animali malati. D'altro canto, l'ecografia toracica può essere considerata un valido supporto diagnostico e di *screening* per il monitoraggio della BRD e l'identificazione dei soggetti malati in allevamento.

La vaccinazione si è rivelata essere uno strumento efficace per la prevenzione della BRD nei vitelli da latte, riducendone l'incidenza in tutti i vari gruppi vaccinali rispetto a quello di controllo. Sia la vaccinazione somministrata per via parenterale che per via intranasale sono state in grado di prevenire l'insorgenza di lesioni a livello polmonare, ma l'associazione tra le due vaccinazioni ha fornito una maggiore protezione e una minore probabilità di contrarre la BRD fino a circa 50 giorni di vita nei vitelli da latte.

È comunque importante ricordare che la prevenzione della BRD richiede anche una particolare attenzione anche alla gestione degli animali, degli ambienti di stabulazione e della biosicurezza dell'allevamento, in modo da rendere più funzionale ed economicamente sostenibile un eventuale investimento dell'allevatore per la profilassi vaccinale della mandria.

BIBLIOGRAFIA

1. Abutarbush, S. M., Al-Rukibat, R. K., Qura'n, W., & Hananeh, W. M. (2019). Laboratory findings of tracheal wash and bronchoalveolar lavage in normal adult dairy cattle. *Journal of Applied Animal Research*, 47(1), 46–53. <https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1561371>
2. Abutarbush, S. M., Pollock, C. M., Wildman, B. K., Perrett, T., Schunicht, O. C., Fenton, R. K., Hannon, S. J., Vogstad, A. R., Jim, G. K., & Booker, C. W. (2012). Evaluation of the diagnostic and prognostic utility of ultrasonography at first diagnosis of presumptive bovine respiratory disease. In *The Canadian Journal of Veterinary Research* (Vol. 76).
3. Aly, S. S., Love, W. J., Williams, D. R., Lehenbauer, T. W., Van Eenennaam, A., Drake, C., Kass, P. H., & Farver, T. B. (2014). Agreement between bovine respiratory disease scoring systems for pre-weaned dairy calves. *Animal Health Research Reviews*, 15(2), 148–150. <https://doi.org/10.1017/S1466252314000164>
4. Babkine, M., & Blond, L. (2009). Ultrasonography of the Bovine Respiratory System and Its Practical Application. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 25, Issue 3, pp. 633–649). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.07.001>
5. Baruch, J., Cernicchiaro, N., Cull, C. A., Lechtenberg, K. F., Nickell, J. S., & Renter, D. G. (2019). Performance of multiple diagnostic methods in assessing the progression of bovine respiratory disease in calves challenged with infectious bovine rhinotracheitis virus and mannheimia haemolytica. *Journal of Animal Science*, 97(6), 2357–2367. <https://doi.org/10.1093/jas/skz107>
6. Bassel, L. L., Tabatabaei, S., & Caswell, J. L. (2020). Host Tolerance to Infection with the Bacteria that Cause Bovine Respiratory Disease. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 36, Issue 2, pp. 349–359). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.003>
7. Berman, J., Francoz, D., Dufour, S., & Buczinski, S. (2019). Bayesian estimation of sensitivity and specificity of systematic thoracic ultrasound exam for diagnosis of bovine respiratory disease in pre-weaned calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 162, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.025>

8. Blond, L., & Buczinski, S. (2009). Basis of Ultrasound Imaging and the Main Artifacts in Bovine Medicine. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 25, Issue 3, pp. 553–565). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.07.002>
9. Bonizzi, S., Gislou, G., Brasca, M., Morandi, S., Sandrucci, A., & Zucali, M. (2022). Air Quality, Management Practices and Calf Health in Italian Dairy Cattle Farms. *Animals*, 12(17). <https://doi.org/10.3390/ani12172286>
10. Booker, C. W., & Lubbers, B. V. (2020). Bovine Respiratory Disease Treatment Failure: Impact and Potential Causes. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 36, Issue 2, pp. 487–496). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.007>
11. Braun, U. (2009). Ultrasonography of the Liver in Cattle. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 25, Issue 3, pp. 591–609). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.07.003>
12. Buczinski, S., Achard, D., & Timsit, E. (2021). Effects of calfhooD respiratory disease on health and performance of dairy cattle: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 104(7), 8214–8227. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19941>
13. Buczinski, S., Fecteau, G., Dubuc, J., & Francoz, D. (2018). Validation of a clinical scoring system for bovine respiratory disease complex diagnosis in preweaned dairy calves using a Bayesian framework. *Preventive Veterinary Medicine*, 156, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.05.004>
14. Buczinski, S., Forté, G., Francoz, D., & Bélanger, A. M. (2014). Comparison of thoracic auscultation, clinical score, and ultrasonography as indicators of bovine respiratory disease in preweaned dairy calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(1), 234–242. <https://doi.org/10.1111/jvim.12251>
15. Buczinski, S., L Ollivett, T., & Dendukuri, N. (2015). Bayesian estimation of the accuracy of the calf respiratory scoring chart and ultrasonography for the diagnosis of bovine respiratory disease in pre-weaned dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 119(3–4), 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.02.018>
16. Buczinski, S., & O'Connor, A. M. (2016). Specific Challenges in Conducting and Reporting Studies on the Diagnostic Accuracy of Ultrasonography in Bovine

- Medicine. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 32, Issue 1, pp. 1–18). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2015.09.009>
17. Buczinski, S., & Pardon, B. (2020). Bovine Respiratory Disease Diagnosis: What Progress Has Been Made in Clinical Diagnosis? In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 36, Issue 2, pp. 399–423). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.004>
 18. Cartee, R. E., Hudson, J. A., & Finn-Bodner, S. (1993). Ultrasonography. In *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* (Vol. 23, Issue 2, pp. 345–377). [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(93\)50032-3](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(93)50032-3)
 19. Caswell, J. L., Hewson, J., Slavić, D., DeLay, J., & Bateman, K. (2012). Laboratory and Postmortem Diagnosis of Bovine Respiratory Disease. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 28, Issue 3, pp. 419–441). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.07.004>
 20. Chamorro, M. F., & Palomares, R. A. (2020). Bovine Respiratory Disease Vaccination Against Viral Pathogens: Modified-Live Versus Inactivated Antigen Vaccines, Intranasal Versus Parenteral, What Is the Evidence? In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 36, Issue 2, pp. 461–472). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.006>
 21. Chase, C. C. L. (2022). Acceptable Young Calf Vaccination Strategies—What, When, and How? In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 38, Issue 1, pp. 17–37). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.11.002>
 22. Confer, A. W. (2009). *Update on bacterial pathogenesis in BRD*. 145–148. <https://doi.org/10.1017/S1466252309990193>
 23. Confer, A. W., & Ayalew, S. (2018). *Mannheimia haemolytica* in bovine respiratory disease: immunogens, potential immunogens, and vaccines. *Animal Health Research Reviews*, 19(2), 79–99. <https://doi.org/10.1017/S1466252318000142>
 24. Cummings, D. B., Meyer, N. F., & Step, D. L. (2022). Bovine Respiratory Disease Considerations in Young Dairy Calves. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 38, Issue 1, pp. 93–105). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.11.007>

25. Dabo, S. M., Taylor, J. D., & Confer, A. W. (2008). *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. In *Animal Health Research Reviews* (Vol. 8, Issue 2, pp. 129–150). <https://doi.org/10.1017/S1466252307001399>
26. Decaris, N., Buczinski, S., Tárdon, D. I. C., Camargo, L., Schllemer, N. R., Hagen, S. C. F., Woolums, A. R., & Gomes, V. (2022). Diagnostic accuracy of Wisconsin and California scoring systems to detect bovine respiratory disease in preweaning dairy calves under subtropical environmental conditions. *Journal of Dairy Science*, *105*(9), 7750–7763. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21491>
27. DesCôteaux, L., Gnemmi, G., & Colloton, J. (2009). Ultrasonography of the Bovine Female Genital Tract. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 25, Issue 3, pp. 733–752). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.07.009>
28. Dubrovsky, S. A., van Eenennaam, A. L., Aly, S. S., Karle, B. M., Rossitto, P. v., Overton, M. W., Lehenbauer, T. W., & Fadel, J. G. (2020). Preweaning cost of bovine respiratory disease (BRD) and cost-benefit of implementation of preventative measures in calves on California dairies: The BRD 10K study. *Journal of Dairy Science*, *103*(2), 1583–1597. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15501>
29. Dunn, T. R., Ollivett, T. L., Renaud, D. L., Leslie, K. E., LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., & Kelton, D. F. (2018). The effect of lung consolidation, as determined by ultrasonography, on first-lactation milk production in Holstein dairy calves. *Journal of Dairy Science*, *101*(6), 5404–5410. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13870>
30. Ellingsen-Dalskau, K., Mejdell, C. M., Holand, T., Ottesen, N., & Larsen, S. (2020). Estimation of minimum tolerated milk temperature for feeding dairy calves with small- and large-aperture teat bottles: A complementary dose-response study. *Journal of Dairy Science*, *103*(11), 10651–10657. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18460>
31. Fiore, E., Lisuzzo, A., Beltrame, A., Contiero, B., Giancesella, M., Schiavon, E., Tessari, R., Morgante, M., & Mazzotta, E. (2022). Lung Ultrasonography and Clinical Follow-Up Evaluations in Fattening Bulls Affected by Bovine Respiratory Disease (BRD) during the Restocking Period and after Tulathromycin and Ketoprofen Treatment. *Animals*, *12*(8). <https://doi.org/10.3390/ani12080994>
32. Francoz, D., Buczinski, S., Bélanger, A. M., Forté, G., Labrecque, O., Tremblay, D., Wellemans, V., & Dubuc, J. (2015). Respiratory Pathogens in Québec Dairy Calves

- and Their Relationship with Clinical Status, Lung Consolidation, and Average Daily Gain. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(1), 381–387. <https://doi.org/10.1111/jvim.12531>
33. Ghanem, M. M., Zeineldin, M. M., Abd El-Raof, Y. M., & El-Attar, H. A. (2016). Lung Ultrasonography and Computer-Aided Scoring System as a Diagnostic Aid for Bovine Respiratory Disease in Feedlot Cattle. *Global Veterinaria*, 17(6), 588–594. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2016.588.594>
 34. Godden, S. M., Lombard, J. E., & Woolums, A. R. (2019). Colostrum Management for Dairy Calves. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 35, Issue 3, pp. 535–556). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.07.005>
 35. Gorden, P. J., & Plummer, P. (2010). Control, management, and prevention of bovine respiratory disease in dairy calves and cows. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 26, Issue 2, pp. 243–259). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.03.004>
 36. Grissett, G. P., White, B. J., & Larson, R. L. (2015). Structured Literature Review of Responses of Cattle to Viral and Bacterial Pathogens Causing Bovine Respiratory Disease Complex. In *Journal of Veterinary Internal Medicine* (Vol. 29, Issue 3, pp. 770–780). <https://doi.org/10.1111/jvim.12597>
 37. Herring, D. S., & Bjornton, G. (1985). Physics, facts, and artifacts of diagnostic ultrasound. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 15(6), 1107–1122. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(85\)50360-5](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(85)50360-5)
 38. Hussein, H. A., Binici, C., & Staufenbiel, R. (2018). Comparative evaluation of ultrasonography with clinical respiratory score in diagnosis and prognosis of respiratory diseases in weaned dairy buffalo and cattle calves. *Journal of Animal Science and Technology*, 60(1). <https://doi.org/10.1186/s40781-018-0187-3>
 39. Krehbiel, C. R. (2020). Bovine Respiratory Disease Influences on Nutrition and Nutrient Metabolism. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 36, Issue 2, pp. 361–373). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.010>
 40. Lago, A., McQuirk, S. M., Bennett, T. B., Cook, N. B., & Nordlund, K. V. (2006). Calf respiratory disease and pen microenvironments in naturally ventilated calf

- barns in winter. *Journal of Dairy Science*, 89(10), 4014–4025. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72445-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72445-6)
41. Larsen, L. E. (2000). Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV): A review. In *Acta vet. scand* (Vol. 41).
 42. Lekeux, P., & Coghe, J. (2007). *Strategia terapeutica per il trattamento del complesso della malattia respiratoria del bovino: l'esperienza belga*. 229–232.
 43. Love, W. J., Lehenbauer, T. W., Van Eenennaam, A. L., Drake, C. M., Kass, P. H., Farver, T. B., & Aly, S. S. (2016). Sensitivity and specificity of on-farm scoring systems and nasal culture to detect bovine respiratory disease complex in preweaned dairy calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(2), 119–128. <https://doi.org/10.1177/1040638715626204>
 44. Lowe, G., Sutherland, M., Waas, J., Schaefer, A., Cox, N., & Stewart, M. (2019). Infrared thermography—A non-invasive method of measuring respiration rate in calves. *Animals*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/ani9080535>
 45. Maier, G. U., Rowe, J. D., Lehenbauer, T. W., Karle, B. M., Williams, D. R., Champagne, J. D., & Aly, S. S. (2019). Development of a clinical scoring system for bovine respiratory disease in weaned dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 102(8), 7329–7344. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15474>
 46. Marsilio, F., Greco, G., Fanelli, A., Cirilli, M., Stella Lucente, M., Attia Koraney Zarea, A., Buonavoglia, D., & Tempesta, M. (2021). Fatal Calf Pneumonia Outbreaks in Italian Dairy Herds Involving *Mycoplasma bovis* and Other Agents of BRD Complex. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 742785. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.742785>
 47. McGill, J. L., & Sacco, R. E. (2020). The Immunology of Bovine Respiratory Disease: Recent Advancements. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 36, Issue 2, pp. 333–348). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.002>
 48. McGuirk, S. M., & Peek, S. F. (2014). Timely diagnosis of dairy calf respiratory disease using a standardized scoring system. *Animal Health Research Reviews*, 73(4), 145–147. <https://doi.org/10.1017/S1466252314000267>

49. Mee, J. F. (2008). Newborn Dairy Calf Management. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 24, Issue 1, pp. 1–17). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.10.002>
50. Mosier, D. (2014). Review of BRD pathogenesis: The old and the new. In *Animal Health Research Reviews* (Vol. 24, Issue 6). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S1466252314000176>
51. Nielsen, S. S., Alvarez, J., Bicout, D. J., Calistri, P., Canali, E., Drewe, J. A., Garin-Bastuji, B., Gonzales Rojas, J. L., Gortazar Schmidt, C., Herskin, M., Michel, V., Miranda Chueca, M. A., Padalino, B., Pasquali, P., Roberts, H. C., Spooler, H., Stahl, K., Velarde, A., Viltrop, A., ... Winckler, C. (2023). Welfare of calves. *EFSA Journal*, 21(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7896>
52. Ollivett, T. L. (2020). How Does Housing Influence Bovine Respiratory Disease in Dairy and Veal Calves? In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 36, Issue 2, pp. 385–398). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.012>
53. Ollivett, T. L., & Buczinski, S. (2016). On-Farm Use of Ultrasonography for Bovine Respiratory Disease. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 32, Issue 1, pp. 19–35). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2015.09.001>
54. Ollivett, T. L., Caswell, J. L., Nydam, D. V., Duffield, T., Leslie, K. E., Hewson, J., & Kelton, D. (2015). Thoracic Ultrasonography and Bronchoalveolar Lavage Fluid Analysis in Holstein Calves with Subclinical Lung Lesions. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(6), 1728–1734. <https://doi.org/10.1111/jvim.13605>
55. Panciera, R. J., & Confer, A. W. (2010). Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 26, Issue 2, pp. 191–214). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.001>
56. Pardon, B., & Buczinski, S. (2020). Bovine Respiratory Disease Diagnosis: What Progress Has Been Made in Infectious Diagnosis? In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 36, Issue 2, pp. 425–444). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.005>

57. Peel, D. S. (2020). The Effect of Market Forces on Bovine Respiratory Disease. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 36, Issue 2, pp. 497–508). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.008>
58. Perez-Casal, J. (2020). Pathogenesis and Virulence of *Mycoplasma bovis*. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 36, Issue 2, pp. 269–278). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.02.002>
59. Peters, A. R., Thevasagayam, S. J., Wiseman, A., & Salt, J. S. (2004). Duration of immunity of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV, and BRSV in experimentally infected calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 66(1–4), 63–77. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.08.001>
60. Poli, G., Dall’Ara, P., Martino, P. A., & Rosati, S. (2017). *Microbiologia e immunologia veterinaria* (terza edizione). Edra S.p.A., Milano
61. Proudfoot, K. L. (2019). Maternal Behavior and Design of the Maternity Pen. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 35, Issue 1, pp. 111–124). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.10.007>
62. Raaperi, K., Bougeard, S., Aleksejev, A., Orro, T., & Viltrop, A. (2012). Association of herd BHV-1 seroprevalence with respiratory disease in youngstock in Estonian dairy cattle. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.10.015>
63. Renaud, D., & Pardon, B. (2022). Preparing Male Dairy Calves for the Veal and Dairy Beef Industry. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 38, Issue 1, pp. 77–92). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.11.006>
64. Richeson, J. T., & Falkner, T. R. (2020). Bovine Respiratory Disease Vaccination: What Is the Effect of Timing? In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 36, Issue 2, pp. 473–485). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.013>
65. Santman-Berends, I. M. G. A., Buddiger, M., Smolenaars, A. J. G., Steuten, C. D. M., Roos, C. A. J., Van Erp, A. J. M., & Van Schaik, G. (2014). A multidisciplinary approach to determine factors associated with calf rearing practices and calf mortality in dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 117(2), 375–387. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.07.011>

66. Schaefer, A. L., Cook, N. J., Church, J. S., Basarab, J., Perry, B., Miller, C., & Tong, A. K. W. (2007). The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory disease complex in calves. *Research in Veterinary Science*, 83(3), 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.01.008>
67. Schaefer, A. L., Cook, N., Tessaro, S. V, Deregt, D., Desroches, G., Dubeski, P. L., Tong, A. K. W., & Godson, D. L. (2004). *Early detection and prediction of infection using infrared thermography*.
68. Shriki, J. (2014). Ultrasound physics. In *Critical Care Clinics* (Vol. 30, Issue 1, pp. 1–24). <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2013.08.004>
69. Smith, B. P., Van Metre, D. C., & Pusterla, N. (2019). *Large Animal Internal Medicine* (Sixth edition). Elsevier, Stati Uniti. Capitolo 31, pp. 2590-2693
70. Smith, R. A., Step, D. L., & Woolums, A. R. (2020). Bovine Respiratory Disease: Looking Back and Looking Forward, What Do We See? In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 36, Issue 2, pp. 239–251). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.03.009>
71. Streeter, R. N., & Step, D. L. (2007). Diagnostic Ultrasonography in Ruminants. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 23, Issue 3, pp. 541–574). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.07.008>
72. Studer, E., Schönecker, L., Meylan, M., Stucki, D., Dijkman, R., Holwerda, M., Glaus, A., & Becker, J. (2021). Prevalence of BRD-related viral pathogens in the upper respiratory tract of Swiss veal calves. *Animals*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/ani11071940>
73. Tharwat, M., & Oikawa, S. (2011). Ultrasonographic evaluation of cattle and buffaloes with respiratory disorders. *Tropical Animal Health and Production*, 43(4), 803–810. <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9766-0>
74. Van Leenen, K., Jouret, J., Demeyer, P., Van Driessche, L., De Cremer, L., Masmeyer, C., Boyen, F., Deprez, P., & Pardon, B. (2020). Associations of barn air quality parameters with ultrasonographic lung lesions, airway inflammation and infection in group-housed calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 181. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105056>
75. Windeyer, M. C., Leslie, K. E., Godden, S. M., Hodgins, D. C., Lissemore, K. D., & LeBlanc, S. J. (2012). The effects of viral vaccination of dairy heifer calves on the

- incidence of respiratory disease, mortality, and growth. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6731–6739. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5828>
76. Wolfger, B., Timsit, E., White, B. J., & Orsel, K. (2015). A Systematic Review of Bovine Respiratory Disease Diagnosis Focused on Diagnostic Confirmation, Early Detection, and Prediction of Unfavorable Outcomes in Feedlot Cattle. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 31, Issue 3, pp. 351–365). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2015.05.005>
77. Wood, D. (2022). Milk Replacer Ingredients: What and Why? In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 38, Issue 1, pp. 133–152). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.11.011>
78. Zhang, X., Ma, T., Cheng, C., Lv, J., Bai, H., Jiang, X., Zhang, Y., & Xin, H. (2022). Effects of waste milk on growth performance, immunity, and gut health of dairy calves. *Animal Feed Science and Technology*, 285. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115241>

SITOGRAFIA

“University of Wisconsin-Madison, Calf Health Scoring Chart” (2018):

<https://www.vetmed.wisc.edu/fapm/wp-content/uploads/2020/01/CalfHealthScoringChart-2018-EN-std.pdf>

RIFERIMENTI NORMATIVI

Direttiva del Consiglio Europeo 2008/119/CE del 18 dicembre 2008, che stabilisce le norme minime per la protezione dei vitelli

D.Lgs. n. 126 del 7 luglio 2011, “Attuazione della direttiva 2008/119/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei vitelli”

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio *in primis* il Prof. Enrico Fiore per aver avuto la pazienza di essere stato il mio relatore, avermi consentito di seguire questo progetto di tesi ed essersi dimostrato sempre disponibile. Un sentito ringraziamento va anche alla Dott.ssa Anastasia Lisuzzo, che ha trovato il tempo di aiutarmi durante la stesura della tesi nonostante i mille impegni. Non posso non citare anche il Dott. Giacomo Catarin, Edo e Leo, che hanno reso più leggere le lunghe giornate di raccolta dati.

Ringrazio anche la mia famiglia, che mi ha permesso di seguire questo percorso di laurea e mi ha sostenuto durante questi cinque anni di studi.

Ci tengo a ringraziare infine tutte le splendide persone che ho incontrato negli anni e che mi sono rimaste vicine (alcune anche nonostante la distanza fisica che ci separa). Inizio con Ali, Leti, Marta, Michi e Marti, conosciute in un campo estivo sperduto nella Maremma laziale ormai una decina di anni fa. Ci sono poi Anna DF, Alice, Anna B. e Ilaria, che dopo i cinque anni di liceo sono rimaste comunque al mio fianco (e che ormai si saranno anche stufate di sentirmi parlare di puledri e vitelli). Non posso non ringraziare anche Anto, Claudio, Eli, Giangio, Linda, Sofia B., Sofi T. e Vale, solo alcuni tra i molti compagni di corso che con la loro presenza e il loro calore hanno reso più leggero affrontare questo percorso di studi. Un grazie speciale a Michele, che mi ha sopportata e supportata nei momenti di difficoltà, con semplicità e affetto. Infine, ultime ma non per importanza, un grazie di cuore alle mie coinquiline Anna, Céci, Giulia e Giuls, che in questo anno e mezzo di convivenza mi hanno dato consigli, hanno corretto le mie mail in inglese, mi hanno sfamata, mi hanno fornito pet therapy gratis e mi hanno sostenuta nei momenti critici.