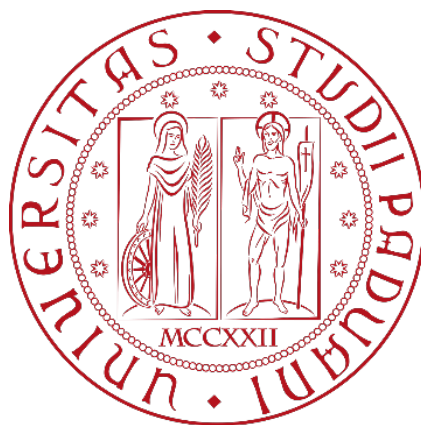




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

**VALUTAZIONE ECOGRAFICA DI
FEGATO, GRASSO DORSALE E
LONGISSIMUS DORSI IN BOVINE DA
LATTE AFFETTE DA CHETOSI**

Relatore: Prof. Enrico Fiore
Correlatore:
Dott.ssa Giorgia Taio
Dott.ssa Anastasia Lisuzzo

Laureanda: Cecilia Bortolami
Matricola n. 2049158

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

I solemnly swear that I am up to no good

INDICE

Sommario

INDICE.....	5
ABSTRACT.....	1
RIASSUNTO.....	3
INTRODUZIONE	5
1. Il periodo di transizione e il suo assetto metabolico	5
1.1 Body condition score (BCS).....	7
1.2 Mobilizzazione delle riserve corporee	10
1.3 Funzionalità e patologie epatiche del periodo di transizione.....	14
2. Patologie nel periodo di transizione nella bovina da latte.....	17
2.1 Chetosi	17
2.2 Lipidosi epatica.....	23
3. Principi fondamentali di diagnostica ecografica.....	27
3.1 Principali artefatti ecografici.....	33
4. Ecografia Epatica.....	36
5. Ecografia dello spessore del grasso dorsale	40
6. Ecografia muscolare	43
OBIETTIVI DELLO STUDIO	46
MATERIALI E METODI	47
1. Dichiarazione etica.....	47
2. Animali e disegno sperimentale	47
3. Prelievo di sangue e suddivisione dei gruppi sperimentali	50
4. Esame ecografico.....	51
5. Analisi statistica	55
RISULTATI.....	57
DISCUSSIONE	61
CONCLUSIONI.....	68
BIBLIOGRAFIA	70

ABSTRACT

The transition period is defined as the interval from three weeks before to three weeks after calving in dairy cows. This period is characterized by negative energy balance (NEB), mobilization of body reserves, and an increased risk of metabolic disorders in dairy cows. Subclinical Ketosis (SCK) is one of the main post-partum metabolic alterations and is characterized by increased blood ketone bodies, particularly β -hydroxybutyrate ($\text{BHB} \geq 1,0 \text{ mmol/L}$).

The aim of the present study was to evaluate ultrasonographic changes in the liver, back-fat thickness (BFT), and *longissimus dorsi* muscle in cows affected by SCK.

60 multiparous Holstein dairy cows from a single farm were enrolled and examined between 5 and 9 days in milk (DIM). Blood BHB concentrations were measured and ultrasonographic examination of the liver, BFT and *longissimus dorsi* muscle were performed at 7, 14, 21, 28 ± 2 DIM. Animals were divided into a control group (CTR; $\text{BHB} < 1,0 \text{ mmol/L}$) and a SCK group (KET; $\text{BHB} \geq 1,0 \text{ mmol/L}$). Cows affected by ketosis showed significantly higher BHB concentrations than healthy cows throughout the study period, with a significant group effect ($p < 0,001$) and higher values in the KET group at 7 DIM (KET= $0,91 \text{ mmol/L}$; CTR= $0,56 \text{ mmol/L}$) and 21 DIM (KET= $0,77 \text{ mmol/L}$; CTR= $0,53 \text{ mmol/L}$).

Results showed a significant decrease in portal vein diameter ($p < 0,023$) (PVD) (KET= $35,40 \text{ mm}$, $35,50 \text{ mm}$ e $35,50 \text{ mm}$; CTR= 39 mm) and portal vein area (PVA) ($p < 0,026$) (KET= $9,06 \text{ cm}^2$, $8,95 \text{ cm}^2$ e $9,50 \text{ cm}^2$; CTR= $10,72 \text{ cm}^2$, $10,59 \text{ cm}^2$, $10,72 \text{ cm}^2$) during the early post-partum period. In contrast, liver depth (LD) was greater in ketotic cows than in healthy cows, exceeding the threshold value proposed for hepatic lipidosis ($p < 0,022$) (KET= 153 mm , 156 mm , 160 mm ; CTR= 153 mm , 149 mm , 150 mm). Cows affected by ketosis also showed greater BFT at the beginning of the study, followed by a marked decrease during the post-partum period, indicating intense mobilization of adipose reserves ($p < 0,009$) (KET= $8,09 \text{ mm}$, $6,04 \text{ mm}$, $5,62 \text{ mm}$; CTR= $6,59 \text{ mm}$, $6,11 \text{ mm}$, $6,22 \text{ mm}$).

Overall, these findings demonstrate that ultrasonography is a valuable, non-invasive tool for monitoring metabolic adaptations in transition dairy cows. Ultrasonographic assessment of hepatic morphology and body reserves may improve the early identification of cows at risk of subclinical ketosis and support herd health management.

RIASSUNTO

Il periodo di transizione della bovina da latte, compreso tra le tre settimane precedenti e le tre settimane successive al parto è caratterizzato da una condizione di bilancio energetico negativo (NEB). La chetosi subclinica (SCK) rappresenta una delle principali alterazioni metaboliche del post partum ed è caratterizzata dall'aumento dei corpi chetonici, in particolare del β -idrossibutirrato ($\text{BHB} \geq 1,0 \text{ mmol/L}$). Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare le modificazioni ecografiche del fegato, dello spessore del grasso sottocutaneo (*Back-Fat Thickness, BFT*) e del muscolo *longissimus dorsi* in bovine affette da chetosi subclinica. Sono state arruolate 60 bovine Frisone pluripare appartenenti ad un unico allevamento, esaminate tra 5 e 9 giorni di lattazione (DIM). A 7, 14, 21 e 28 ± 2 DIM sono stati effettuati il dosaggio ematico del BHB e l'esame ecografico del fegato, del BFT e del muscolo *longissimus dorsi*. Gli animali sono stati suddivisi in un gruppo controllo (CTR; $\text{BHB} < 1,0 \text{ mmol/L}$) e un gruppo affetto da chetosi subclinica (KET; $\text{BHB} \geq 1,0 \text{ mmol/L}$). Le bovine affette da chetosi hanno mostrato concentrazioni di BHB significativamente più elevate rispetto alle bovine sane durante il periodo di studio, con un effetto significativo del gruppo ($p < 0,001$) e valori superiori nel gruppo KET a 7 DIM (KET= $0,91 \text{ mmol/L}$; CTR= $0,56 \text{ mmol/L}$) e 21 DIM (KET= $0,77 \text{ mmol/L}$; CTR= $0,53 \text{ mmol/L}$). Inoltre, hanno presentato una significativa riduzione ($p < 0,023$) del diametro della vena porta (PVD) (KET= $35,40 \text{ mm}$, $35,50 \text{ mm}$ e $35,50 \text{ mm}$; CTR= 39 mm) e dell'area della vena porta (PVA) ($p < 0,026$) (KET= $9,06 \text{ cm}^2$, $8,95 \text{ cm}^2$ e $9,50 \text{ cm}^2$; CTR= $10,72 \text{ cm}^2$, $10,59 \text{ cm}^2$, $10,72 \text{ cm}^2$) nelle prime fasi del post-parto, mentre la profondità del fegato (LD) è risultata significativamente maggiore ($p < 0,022$) rispetto alle bovine sane, superando il valore soglia proposto per la lipidosi epatica (KET= 153 mm , 156 mm , 160 mm ; CTR= 153 mm , 149 mm , 150 mm). Le bovine affette da chetosi hanno inoltre evidenziato maggiore BFT all'inizio dello studio, seguito da una marcata riduzione nel corso del post-parto, indicativa di un'intensa mobilitazione delle riserve adipose ($p < 0,009$) (KET= $8,09 \text{ mm}$, $6,04 \text{ mm}$, $5,62 \text{ mm}$; CTR= $6,59 \text{ mm}$, $6,11 \text{ mm}$, $6,22 \text{ mm}$). Nel complesso, i risultati dimostrano che l'ecografia rappresenta uno strumento non invasivo utile per il monitoraggio degli adattamenti metabolici nel periodo di transizione. La valutazione ecografica della morfologia epatica e delle riserve corporee può contribuire all'identificazione precoce delle bovine a rischio di chetosi subclinica e migliorare la gestione sanitaria della mandria.

INTRODUZIONE

1. Il periodo di transizione e il suo assetto metabolico

Il periodo di transizione nella bovina da latte è definito come l'intervallo compreso tra le tre settimane precedenti il parto e le tre settimane successive ad esso (Pascottini et al., 2020). Questa fase è considerata fisiologica e cruciale, durante la quale si verificano profonde modificazioni dell'assetto metabolico dell'animale (Abuelo et al., 2021).

Tali cambiamenti sono determinati da rapidi mutamenti nei profili ormonali, dai processi di ripartizione dei nutrienti e dall'adattamento del metabolismo alle condizioni di bilancio energetico negativo (Negative Energy Balance, NEB), che si instaurano in risposta alle elevate richieste metaboliche dell'ultima fase della gestazione e dell'inizio della lattazione (Mezzetti et al., 2021).

Nel periodo che precede il parto, la crescita del feto e i relativi fabbisogni di nutrienti ed energia raggiungono livelli massimi. Allo stesso tempo, l'ingestione volontaria di alimento da parte dell'animale si riduce, a causa sia dell'aumento di volume occupato dal feto sia dell'utero, notevolmente ingranditi in cavità addominale (Bell, 1995).

Nel periodo successivo al parto invece, le bovine sono sottoposte ad un cambiamento repentino della dieta, con il passaggio da un'alimentazione tipica dell'asciutta, basata prevalentemente sui foraggi, ad una razione ad alto contenuto di concentrati, necessaria per sostenere la lattazione (Caixeta and Omontese, 2021).

Nonostante questo cambiamento nutrizionale, nelle prime settimane dopo il parto, l'ingestione alimentare non riesce a compensare le elevate esigenze energetiche legate alla produzione di latte. Di conseguenza, la bovina entra in una condizione di NEB, caratterizzata dalla mobilitazione delle riserve corporee, in particolare del tessuto adiposo, anche quando l'ingestione volontaria tende progressivamente ad aumentare (Weber et al., 2013).

Il NEB risulta di grande interesse nel settore della vacca da latte poiché oltre ad influenzare in modo significativo le prestazioni produttive e riproduttive delle singole bovine, rappresenta anche un importante indicatore del benessere animale. In particolare, gli animali in NEB tendono a manifestare una riduzione della condizione corporea, soprattutto nel periodo successivo al parto. Questa perdita di condizione corporea rappresenta un importante indicatore di ridotto benessere animale (Bekuma, 2019).

Il bilancio energetico è definito come la differenza tra l'energia assunta attraverso l'alimentazione e l'energia richiesta per il mantenimento corporeo, la produzione e la gestazione (Wang et al., 2022).

Quando tale differenza risulta negativa, l'animale va incontro ad una serie di adattamenti fisiologici e metabolici che possono compromettere diversi aspetti della sua efficienza produttiva e riproduttiva, oltre a determinare un indebolimento del sistema immunitario. Queste alterazioni nella vacca da latte avvengono nella prima fase della lattazione, periodo in cui il fabbisogno energetico cresce rapidamente (Bekuma, 2019).

In questa prima fase, avvengono delle variazioni dello stato metabolico delle bovine, le quali influenzano in modo significativo la produzione del fattore di crescita insulina-simile (IGF) e di altri metaboliti correlati. Poiché l'IGF svolge un ruolo fondamentale nella crescita follicolare e nello sviluppo embrionale, una sua riduzione o alterazione comporta inevitabilmente un peggioramento del potenziale riproduttivo dell'animale (Hailay et al., 2019).

Le alterazioni del metabolismo possono compromettere la risposta immunitaria; tali alterazioni determinano nella bovina da latte una ridotta capacità di mantenere un adeguato equilibrio immuno-metabolico, favorendo al contempo un aumento dello stato infiammatorio (Arfuso et al., 2023).

Il NEB esercita un'influenza significativa sull'equilibrio ormonale, sulle funzioni degli organi nelle bovine e sulla composizione dei principali componenti del latte, quali proteine, grassi e lattosio. Acidi grassi non esterificati (NEFA), β -idrossibutirrato (BHB) e trigliceridi epatici si presentano con concentrazioni sistemiche aumentate; l'aumento di queste sostanze è il risultato di una ridotta disponibilità di glucosio circolante che consegue in una mobilitazione eccessiva delle riserve lipidiche attraverso processi di lipolisi e chetogenesi (Puppel and Kuczyńska, 2016).

Il grado di NEB nel precoce post-partum, così come la velocità con cui l'animale riesce a ristabilire un equilibrio energetico positivo, rappresentano fattori determinanti per lo stato di salute generale e la produttività della bovina da latte. La dinamica con cui tali cambiamenti metabolici avvengono, insieme anche ai rilievi e ai metodi diagnostici utilizzati, riveste una grande importanza poiché il NEB è strettamente correlato alla comparsa di patologie cliniche e subcliniche tipiche del post-partum, oltre che ad influenzare direttamente la lattazione e le performance riproduttive (Rousing et al., 2020).

Tutti questi aspetti considerati hanno ripercussioni significative non solo sul benessere animale, ma anche sul profitto complessivo dell'azienda, rendendo perciò fondamentale una corretta gestione nutrizionale e metabolica durante tutto il periodo di transizione (Kessel et al., 2008).

1.1 Body condition score (BCS)

Il body condition score (BCS) di una bovina è una valutazione della proporzione di grasso corporeo dell'animale (Roche et al., 2009). È un sistema di valutazione sviluppato per conferire maggiore oggettività alla determinazione della condizione corporea dell'animale.

Questo parametro è ampiamente utilizzato nella gestione della mandria perché consente di valutare il livello nutrizionale delle bovine correlandolo all'ingestione dell'alimento, all'assunzione relativa di energia, allo stadio di lattazione e infine alla produzione latte (Peek and Divers, 2018).

Il BCS viene valutato utilizzando diverse scale e approcci, ma generalmente si utilizza una scala a 5 punti che va da estremamente magro (1) a molto grasso (5) con intervalli di 0,25 (Figura 1). A prescindere dalla scala di valutazione adottata, valori bassi di BCS indicano bovine con ridotte riserve di tessuto adiposo, mentre valori elevati identificano animali con abbondanti riserve di grasso corporeo (Edmonson et al., 1989).

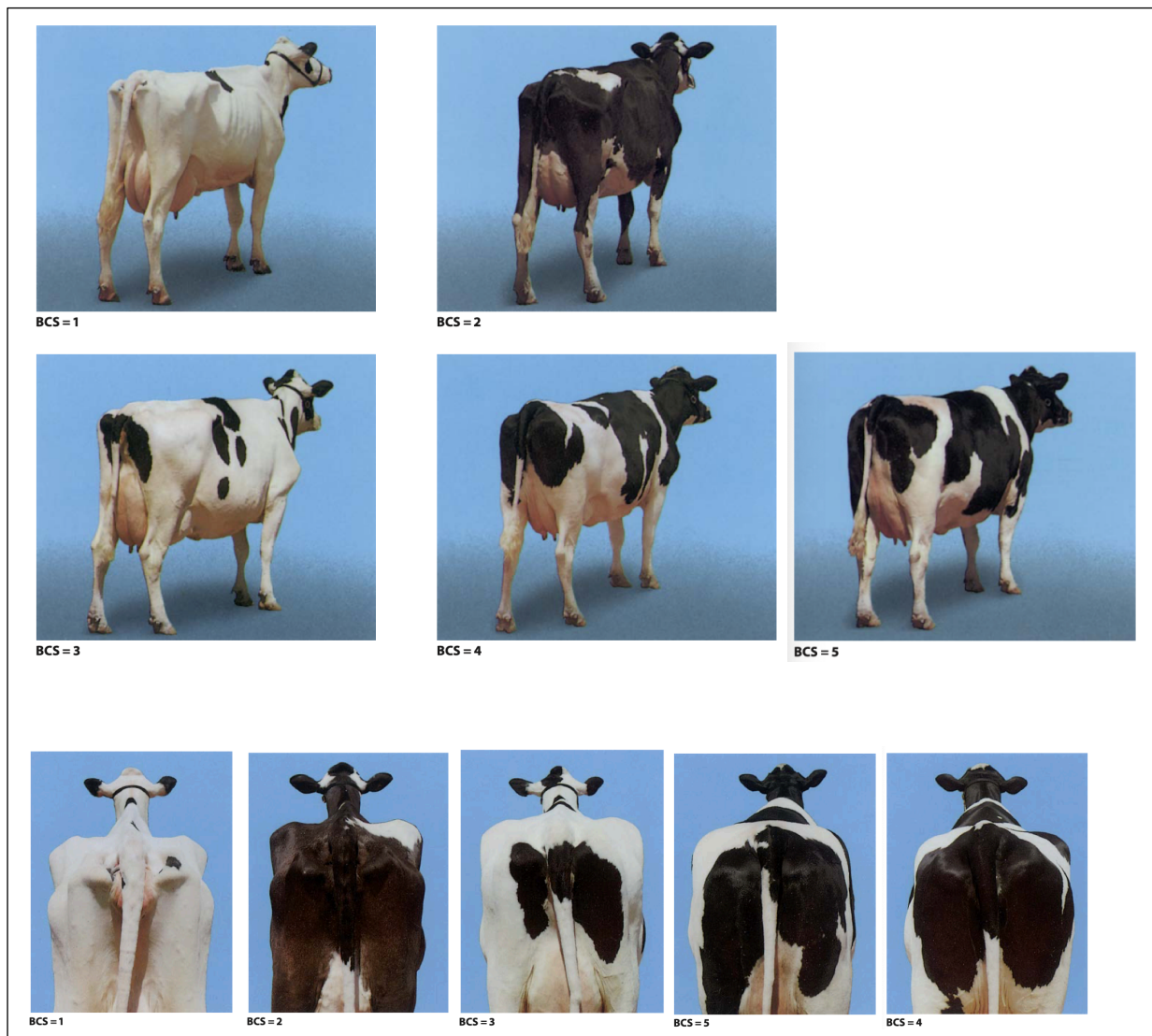
La determinazione del BCS si esegue tramite l'osservazione e la palpazione della regione dorsale lombare, dei processi trasversi delle vertebre lombari e dall'attaccatura della coda come mostrato nella Figura 1 (Peek and Divers, 2018).

Lo scanner ad ultrasuoni e le immagini digitali statiche della bovina sono altri due metodi che possono essere utilizzati per la misurazione del BCS. Questi metodi, in particolare le immagini digitali, eliminano l'errore dell'operatore e consentono la rilevazione di variazioni a breve termine della condizione corporea (Bell et al., 2018).

Idealmente il BCS dovrebbe essere valutato al momento della messa in asciutta, al parto, al picco di produzione latte (approssimativamente intorno ai 70-90 giorni di lattazione) e durante la metà della lattazione. I valori standard risultano alla messa in asciutta, al parto e a metà della lattazione 3,0-3,25, mentre al picco di produzione latte 2,5-3,0. Il peso vivo varia da 17 kg a 41 kg per ogni unità di BCS persa, rispettivamente nelle vacche da latte Holstein-Friesian primipare e pluripare (Caixeta and Omontese, 2021).

I valori di BCS standard al momento del parto sono stati determinati in base all'osservazione della variazione dell'ingestione di sostanza secca durante la prima fase della lattazione correlata alla produzione di latte. Un BCS pari a 3,0-3,25 su 5 al parto, permette di massimizzare la produzione di latte successiva e diminuisce il rischio di patologie metaboliche ed infettive (Garnsworthy, 2007). Un BCS al momento del parto più basso rispetto al range standard è associato ad una ridotta produzione e prestazioni riproduttive da parte della bovina. Un BCS al parto maggiore a 3,5 su 5 è associato ad una minore produzione di latte, ad una riduzione dell'ingestione di sostanza secca (SS) all'inizio della lattazione e ad un aumento del rischio di disturbi metabolici (Roche et al., 2009). I principali disordini metabolici del periodo di periparto a cui una bovina con un BCS non adeguato risulta maggiormente predisposta includono chetosi clinica e subclinica, ipocalcemia, dislocazione dell'abomaso e lipidosi epatica. La Chetosi clinica e subclinica, l'ipocalcemia, la dislocazione abomasale e la lipidosi epatica sono i principali disordini metabolici del periparto a cui una bovina con un non adeguato valore di BCS è predisposta (Çolakoglu et al., 2019).

***Figura 1:** Sistema di valutazione del Body Condition Score (BCS) nella bovina da latte secondo una scala a 5 punti (1 = estremamente magra; 5 = obesa). La figura illustra gli aspetti morfologici caratteristici osservabili in vista postero-laterale (parte superiore) e posteriore (parte inferiore), utilizzati per la stima delle riserve corporee dell'animale. Il BCS costituisce uno strumento ampiamente impiegato per monitorare lo stato nutrizionale e metabolico delle bovine da latte durante le diverse fasi del ciclo produttivo.*



Tratto da Edmonson et al., 1989; immagini da Peek and Divers, 2018

1.2 Mobilizzazione delle riserve corporee

Durante il periodo di transizione, le bovine da latte affrontano una fase di NEB che comporta l'attivazione di diversi meccanismi di mobilizzazione delle riserve corporee. In questo contesto, sia il tessuto adiposo sia quello muscolare vengono coinvolti, contribuendo rispettivamente alla mobilizzazione lipidica e proteica (Barletta et al., 2017). Tali processi, regolati da differenti vie metaboliche e ormonali, permettono all'animale di far fronte alle elevate richieste energetiche e nutrizionali tipiche del post-partum (Ospina et al., 2010).

La mobilizzazione delle riserve lipidiche corporee rappresenta un meccanismo adattativo fisiologico regolato dal sistema endocrino, che consente ai mammiferi di far fronte a periodi di carenza energetica. Questo processo riveste un ruolo particolarmente rilevante nella bovina da latte durante il periodo di transizione (Angeli et al., 2019).

In tale contesto, la lipolisi è stimolata da specifici cambiamenti ormonali: la riduzione delle concentrazioni plasmatiche di insulina e glucosio, la diminuita sensibilità insulinica nei tessuti periferici, il disaccoppiamento dell'asse somatotropo e l'aumento delle concentrazioni di catecolamine, ormone della crescita e glucocorticoidi (Herdt, 2000).

Questi meccanismi determinano l'attivazione delle lipasi, con conseguente idrolisi dei trigliceridi in glicerolo e NEFA, che vengono rilasciati nel circolo sanguigno legati principalmente all'albumina. L'aumento delle concentrazioni plasmatiche di NEFA rappresenta quindi un indicatore diretto della mobilizzazione delle riserve lipidiche (Contreras and Sordillo, 2011).

A livello epatico, i NEFA possono essere completamente ossidati per la produzione di energia, ri-esterificati in trigliceridi ed esportati sotto forma di lipoproteine a bassissima densità (VLDL), oppure accumulati negli epatociti, contribuendo allo sviluppo di lipidosi epatica (White, 2015).

Quando l'apporto di glucosio derivante dal metabolismo ruminale risulta insufficiente, il fegato intensifica l'utilizzo dei NEFA. Tuttavia, l'eccessivo afflusso di acidi grassi può saturare il ciclo di Krebs, portando alla formazione di corpi chetonici, tra cui acido acetoacetico, acetone e BHB (Aschenbach et al., 2010). L'aumento delle concentrazioni ematiche di NEFA e BHB rappresenta un segno caratteristico del periodo di transizione, soprattutto nelle bovine ad alta produzione (Bell, 1995).

Il ruolo del tessuto muscolare nel NEB risulta tuttora meno approfondito rispetto a quello del tessuto adiposo (Mann et al., 2016).

Tuttavia, evidenze recenti suggeriscono che la mobilitazione delle riserve proteiche rappresenti un processo rilevante durante il periodo periparto. In particolare, la degradazione del tessuto muscolare sembra avere inizio già in prossimità al parto, anticipando la mobilitazione del tessuto adiposo, sebbene i meccanismi fisiologici e metabolici alla base di questo fenomeno non siano ancora completamente chiariti (van der Drift et al., 2012).

La mobilitazione delle proteine muscolari risulta generalmente limitata alle prime settimane post-partum, estendendosi indicativamente fino a 3-5 settimane di lattazione, mentre la mobilitazione lipidica può proseguire per un periodo più prolungato, fino ad almeno 8 settimane dopo il parto (van Knegsel et al., 2007).

La degradazione del tessuto muscolare, valutabile attraverso indicatori come la 3-metilistidina (3-MH), fornisce amminoacidi glucogenici destinati alla gluconeogenesi epatica, contribuendo al mantenimento dell'omeostasi energetica nelle fasi più critiche del NEB (Doepel et al., 2002).

Dal punto di vista metabolico, una maggiore disponibilità di precursori glucogenici derivanti dalla mobilitazione proteica potrebbe influenzare la produzione di corpi chetonici, sebbene la relazione tra il catabolismo muscolare e le concentrazioni di BHB non sia ancora completamente chiarita (van der Drift et al., 2012).

Un'elevata mobilitazione delle riserve lipidiche, frequentemente associata ad un BCS elevato nel periodo preparto, rappresenta un rilevante fattore predisponente allo sviluppo di iperchetonemia nel post-partum. In tale contesto, un approfondimento del ruolo della mobilitazione proteica potrebbe contribuire ad una più chiara comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base dei disordini metabolici tipici del periodo di transizione (Busato et al., 2002).

Le bovine con una condizione corporea più bassa risultano maggiormente predisposte alla mobilitazione del tessuto muscolare nel post-partum, probabilmente a causa della limitata disponibilità delle riserve adipose, che induce l'organismo a ricorrere al compartimento proteico come fonte alternativa di substrati energetici (Barletta et al., 2017).

La perdita di massa muscolare contribuisce inoltre alle variazioni del BCS, rendendo necessario considerare congiuntamente la componente lipidica e quella proteica nella

valutazione complessiva della mobilizzazione delle riserve corporee (Hatfield et al., 2022).

Tuttavia, nonostante questa valutazione congiunta sia comunemente adottata, la riduzione dello spessore muscolare non ha mostrato una chiara correlazione con la mobilizzazione lipidica. Questo dato suggerisce che i processi di mobilizzazione del tessuto muscolare e adiposo possano essere regolati, almeno in parte, da meccanismi distinti (Siachos et al., 2021). Inoltre, è stato osservato che un marcato catabolismo del tessuto muscolare nel periodo peri partorienti può risultare associato ad un peggioramento delle performance riproduttive nelle bovine (Hatfield et al., 2022).

Lo spessore del muscolo *longissimus dorsi* (LDT) tende a ridursi sia nel periodo preparto sia nel post-partum. Tale mobilizzazione presenta tuttavia una marcata variabilità tra gli allevamenti, suggerendo l'influenza di fattori gestionali e ambientali che non sarebbero completamente identificabili mediante il solo BCS (Valergakis et al., 2011). Sebbene il BCS costituisca un parametro utile per la stima delle riserve adipose e, in misura parziale, della componente muscolare, la valutazione ecografica del LDT permette una quantificazione più precisa e oggettiva della mobilizzazione proteica (Ryder et al., 2023). È stato evidenziato che soggetti con valori iniziali più elevati di LDT tendono a presentare una maggiore perdita di tessuto muscolare, mentre lo spessore del grasso dorsale (*backfat thickness*, BFT) non risulta direttamente correlato a questo processo, indicando una possibile dissociazione tra la mobilizzazione delle riserve lipidiche e quella delle riserve proteiche (van der Drift et al., 2012).

Il BFT corrisponde allo strato di tessuto adiposo sottocutaneo compreso tra la cute e la *fascia trunci profonda*; in questa sede anatomica, tale fascia si colloca superiormente ai muscoli *gluteus medius* e *longissimus dorsi* (Schröder and Staufienbiel, 2006).

Lo spessore muscolare è influenzato da fattori individuali, tra cui l'ordine di parto: le bovine alla seconda lattazione tendono a presentare valori di LDT inferiori rispetto alle manze e alle pluripare, verosimilmente a causa di una incompleta ricostituzione del tessuto muscolare tra il primo e il secondo parto, in relazione alle concomitanti richieste di crescita e produzione (Jaurena and Moorby, 2017). Allo stesso tempo, anche i fattori ambientali rivestono un ruolo rilevante; in particolare, la gestione nutrizionale durante il periodo di asciutta e lattazione può incidere significativamente sullo LDT (Hatfield et al., 2022).

Nel loro insieme, queste evidenze suggeriscono che la mobilizzazione proteica rappresenti un fenomeno complesso e multifattoriale, solo in parte correlato alla mobilizzazione lipidica, e che richiede l'impiego di metodiche di valutazione specifiche per una corretta quantificazione e interpretazione (Jaurena and Moorby, 2017).

1.3 Funzionalità e patologie epatiche del periodo di transizione

Il fegato svolge un ruolo centrale nel metabolismo della bovina da latte, coordinando il flusso dei nutrienti necessari a supportare gravidanza e lattazione. Durante queste fasi fisiologiche, esso assume funzioni fondamentali nell'ottimizzazione della produzione di latte, nella prevenzione delle malattie metaboliche e infettive e nel mantenimento di adeguate prestazioni riproduttive (Angeli et al., 2019).

Le vacche da latte risultano particolarmente predisposte allo sviluppo di patologie epatiche di natura metabolica; questa predisposizione rende il corretto funzionamento del fegato un elemento chiave per la salute e la produttività dell'animale (Du et al., 2018).

La funzionalità epatica è strettamente correlata a variazioni enzimatiche a livello plasmatico. Gli enzimi epatici specifici sono l'aspartato aminotransferasi (AST), l'alanina aminotransferasi (ALT) e la gamma-glutamyl transferasi (GGT); oltre a questi enzimi è fondamentale anche la misurazione della concentrazione ematica di bilirubina (Puppel and Kuczyńska, 2016).

L'ALT è un enzima citoplasmatico il cui aumento a livello sierico è indicativo di danno cellulare, in particolare a carico degli epatociti e dei miociti scheletrici. Tale enzima rappresenta un utile indicatore di danno epatocellulare nei cani e nei gatti; al contrario nei ruminanti i livelli di ALT risultano bassi, rendendone limitata la rilevanza diagnostica (Tufarelli et al., 2023). Da ciò ne consegue che la correlazione tra l'aumento sierico di tale enzima e le patologie di natura epatica risulta insignificante. L'età e l'attività muscolare influenzano l'attività dell'ALT nel plasma sanguigno (Stojević et al., 2005).

L'AST è un enzima sia citoplasmatico sia mitocondriale distribuito in numerosi tessuti, con la massima attività riscontrata a livello epatico. Tale enzima, a differenza dell'ALT, è comunemente utilizzato per la valutazione del danno epatocellulare nei ruminanti (Breda et al., 2023).

Nonostante l'AST rappresenti un parametro comunemente impiegato nella valutazione del danno epatocellulare, un incremento della sua attività sierica può essere riscontrato anche in caso di lesioni muscolari, fenomeni emolitici e altri processi patologici. In particolare, nei ruminanti, un aumento dell'attività dell'AST può essere osservato in caso di lipidosi epatica, congestione venosa passiva e patologie che determinano distensione dei prestomaci e dell'abomaso (Proios and Grünberg, 2023).

La GGT è un enzima presente a livello epatobiliare e in misura minore anche a livello renale e pancreatico. Un suo aumento a livello sierico può essere causato da epatopatie, steatosi, pancreatiti, patologie biliari e colestasi (spesso di origine parassitaria) (Imhasly et al., 2014).

La concentrazione di bilirubina totale misurabile nel sangue è data dalla somma della frazione indiretta (non coniugata) e di quella diretta (coniugata). La bilirubina indiretta o non coniugata è un prodotto del catabolismo dell'emoglobina che raggiunge il fegato attraverso il circolo sanguigno legata all'albumina. La bilirubina diretta o coniugata è il prodotto derivante dalla coniugazione della bilirubina indiretta con l'acido glucuronico a livello epatico, successivamente escreta con la bile. Un aumento della bilirubina totale può essere causato da problematiche epatiche quali steatosi epatica, epatite, colestasi o da anemie emolitiche (Stefani et al., 2011).

Durante il periodo di transizione, i livelli di bilirubina possono essere modulati indirettamente dall'azione di citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-1 e IL-6). A livello epatico, tali mediatori inducono una risposta di fase acuta, caratterizzata da un incremento della sintesi di proteine di fase acuta positive, come aptoglobina e ceruloplasmina, e da una riduzione di quelle negative, tra cui l'albumina e paraoxonasi (Bertoni et al., 2008). In questo contesto, la diminuzione dell'attività degli enzimi coinvolti nella clearance della bilirubina può favorirne l'accumulo nel fegato e determinare un aumento delle concentrazioni ematiche, con possibili ripercussioni sulla funzionalità epatica (Bertoni and Trevisi, 2013).

La bilirubina diretta e indiretta mostra inoltre correlazioni significative con l'adiponina, un'adipochina coinvolta nella regolazione del metabolismo energetico. Tali associazioni possono manifestarsi nel tempo, suggerendo un'interazione dinamica tra metabolismo epatico e questa adipochina (Kenari et al., 2024).

In condizioni fisiologiche, i parametri epatici, inclusi gli enzimi e la bilirubina, possono andare incontro a variazioni nel corso della lattazione. In particolare, le attività di ALT e AST risultano più elevate nelle fasi iniziali della lattazione rispetto a quelle avanzate, mentre la GGT mostra un andamento opposto, con valori più bassi in lattazione precoce e più elevati nelle fasi successive (Stefani et al., 2011).

Le concentrazioni di bilirubina tendono ad aumentare lievemente nelle fasi immediatamente precedenti il parto, seguite da un incremento più marcato durante la prima settimana post-partum. I valori ritornano progressivamente a livelli comparabili a

quelli del periodo di asciutta entro quattro- cinque settimane di lattazione (Bertoni et al., 2008).

Il mantenimento della salute e dell'elevata produttività delle vacche durante il periodo di transizione rappresenta una delle sfide più complesse nella gestione dell'allevamento da latte. È stato documentato che circa il 75% delle malattie metaboliche nei bovini da latte si manifesta nel primo mese successivo al parto (Abuelo et al., 2021).

Le patologie che incorrono in questo periodo vengono comunemente definite malattie da produzione della vacca da latte. Tradizionalmente, questo termine veniva utilizzato per indicare i principali disordini metabolici delle bovine quali l'ipocalcemia, l'ipomagnesiemia, la chetosi e l'acidosi ruminale (Tufarelli et al., 2023).

Oggi, tuttavia, il concetto di "malattia da produzione" ha assunto un significato più ampio includendo condizioni come la ritenzione di placenta, la dislocazione dell'abomaso e la laminite (Mulligan and Doherty, 2008).

Queste patologie rappresentano l'espressione dell'incapacità dell'animale di adattarsi in modo efficace alle elevate richieste metaboliche che si verificano nel passaggio dallo stato di gravidanza e non lattazione all'inizio della lattazione (Mezzetti et al., 2021).

Esse costituiscono tuttora una delle principali cause di perdite economiche per l'intera filiera lattiero-casearia, in quanto incidono negativamente sulla produttività, sulla salute e sul benessere delle bovine (Maltz, 2020).

Il fegato riveste un ruolo centrale nell'adattamento metabolico durante il periodo di transizione, in quanto coordina il metabolismo dei nutrienti e l'attività endocrina dell'animale. Un aspetto chiave è il ruolo che svolge l'infiammazione metabolica epatica. Le citochine pro-infiammatorie insieme alle proteine di fase acuta modulano il metabolismo epatico, in particolare possono ridurre l'assunzione di alimento, favorire la lipolisi e aggravare il NEB. Questi mediatori sono in grado di alterare l'espressione genica epatica promuovendo: l'aumento dell'ossidazione degli acidi grassi e della chetogenesi, l'accumulo di lipidi nel fegato, la riduzione della sintesi proteica epatica e l'aumento dello stress ossidativo (Wankhade et al., 2017).

L'interazione tra metabolismo energetico e la risposta infiammatoria epatica gioca un ruolo cruciale nel determinare la salute, la produttività e le performance riproduttive nel periodo post-partum (Mulligan and Doherty, 2008).

2. Patologie nel periodo di transizione nella bovina da latte

2.1 Chetosi

La chetosi è una condizione metabolica caratterizzata da un aumento della concentrazione di corpi chetonici nell'organismo (Peek and Divers, 2018). Questa patologia si manifesta principalmente tra la seconda e la settima settimana dopo il parto ed è strettamente correlata ad una situazione di NEB, che induce un'elevata mobilitazione delle riserve lipidiche sotto forma di triacilgliceroli (TAGs) (Yang et al., 2019). I TAGs, prima di raggiungere il fegato, vengono idrolizzati perdendo una molecola estere, facilitando così il trasporto nel circolo ematico. Una volta giunti a livello epatico, vengono metabolizzati e convertiti in corpi chetonici, principalmente BHB, acetoacetato e acetone (Bezerra et al., 2014).

Questa patologia metabolica viene comunemente classificata sulla base di un criterio clinico in chetosi subclinica e chetosi clinica (Puppel and Kuczyńska, 2016). Le differenze tra le due forme di malattia sono riportate nella Figura 2:

- La chetosi subclinica (SCK) è definita come la presenza di elevate concentrazioni di corpi chetonici (BHB, acetoacetato e acetone) nel circolo ematico, nelle urine o nel latte, in assenza di segni clinici evidenti (Raboisson et al., 2014).
- La chetosi clinica è definita come un aumento dei corpi chetonici nel sangue, nel latte e nelle urine associato alla comparsa di segni clinici evidenti, quali inappetenza, feci secche o stipsi, rapida perdita di peso, riduzione della produzione latte e peggioramento delle performance riproduttive, talvolta accompagnati da forme nervose. I parametri vitali (temperatura, frequenza respiratoria e frequenza cardiaca) generalmente non variano dai range fisiologici, a meno che non coesistano altre condizioni patologiche (Gordon et al., 2013).

Figura 2: Confronto tra chetosi clinica e chetosi subclinica nella bovina da latte. La figura riassume le principali differenze tra le due forme in termini di gravità della patologia, cause predisponenti e manifestazioni cliniche. Differenza tra chetosi clinica e subclinica.

Tipo di Chetosi	Descrizione	Cause	Segni Clinici
CHETOSI CLINICA 	Forma più grave di chetosi con segni clinici distinti	NEB persistente; spesso seguito da chetosi subclinica se non trattata o non rilevata	• Marcata perdita di appetito  • Calo nella produzione latte  • Perdita di peso  • Alito acetone 
CHETOSI SUBCLINICA 	Forma moderata di chetosi senza ovvi segni clinici ma determinata da elevati livelli di chetoni nel sangue	Inadeguato bilancio energetico, stress ed elevata produzione latte	• Spesso asintomatica; può mostrare lieve calo nella produzione latte e di appetito se non gestita  

Immagine tratta da Saradhi et al., 2024.

La gravità delle manifestazioni cliniche non risulta sempre direttamente correlata ai livelli di chetonemia; essa sembra piuttosto dipendere dalla capacità individuale dell'animale di metabolizzare e tollerare i corpi chetonici (McArt et al., 2011). La prevalenza di SCK nelle bovine da latte in Europa risulta compresa tra l'11% e il 49%, presente soprattutto nel primo mese di lattazione. Tale condizione rappresenta un importante fattore di rischio per l'insorgenza di diverse patologie, tra cui dislocazione dell'abomaso, metrite, mastite, zoppie e chetosi clinica (Mostert et al., 2018). L'incidenza della chetosi clinica varia generalmente dal 2% al 15%, soprattutto nel primo mese di lattazione (Duffield, 2000). Oltre a questa classificazione, la chetosi può essere suddivisa in tre tipologie. La patogenesi della chetosi è descritta nella Figura 3.

Figura 3: Schema riassuntivo della patogenesi della chetosi nella bovina da latte durante il periodo di transizione. Il bilancio energetico negativo determina una riduzione della disponibilità di glucosio e un aumento della mobilizzazione degli acidi grassi dal tessuto adiposo. Nel fegato, l'eccessiva produzione di acetyl-CoA, associata a un'insufficiente disponibilità di ossalacetato per il ciclo di Krebs, favorisce la sintesi dei corpi chetonici (acetoacetato, β -idrossibutirrato e acetone). L'accumulo di questi metaboliti nel sangue, con successiva eliminazione attraverso latte e urine, porta allo sviluppo della chetosi.

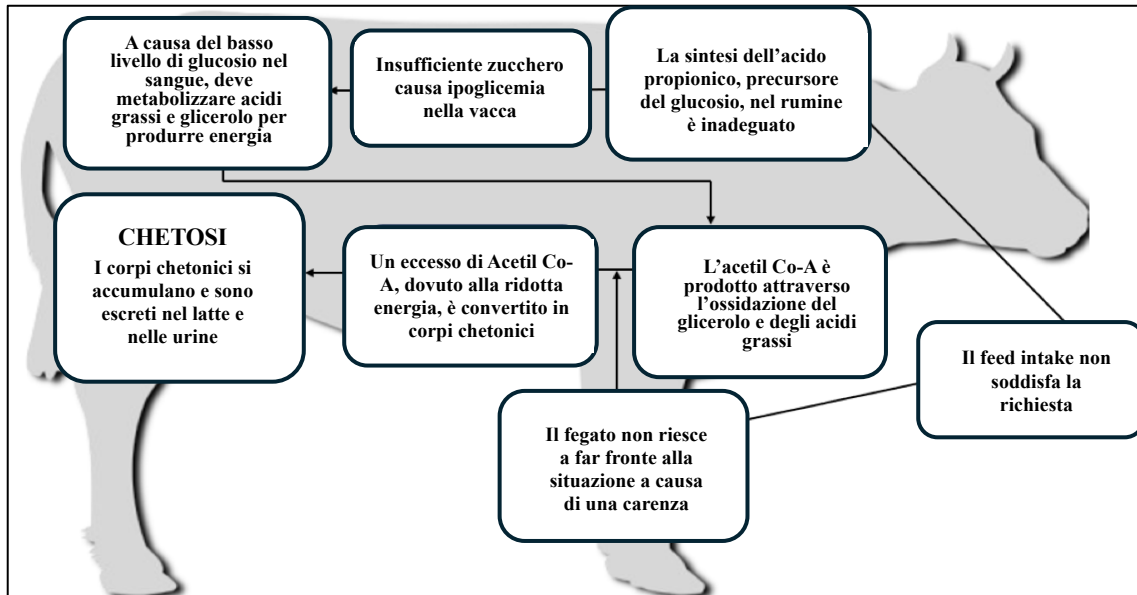


Immagine tratta da Saradhi et al., 2024.

La chetosi di tipo I, o primaria, si manifesta tipicamente tra le 3 e 6 settimane post-partum, quando la richiesta di glucosio supera la capacità gluconeogenica del fegato. Tale periodo corrisponde generalmente al picco di lattazione (Herdt, 2000). La ridotta disponibilità di precursori glucogenici causa ipoglicemia e bassi livelli di insulina, con conseguente attivazione della carnitina palmitoil-transferasi I (CPT-I), enzima chiave nel metabolismo dei grassi, e rapido ingresso dei NEFA nei mitocondri epatici. L'ossidazione mitocondriale dei NEFA produce elevate quantità di corpi chetonici, mentre la minima esterificazione limita l'accumulo di trigliceridi nel fegato, determinando un quadro caratterizzato da chetosi in assenza di fegato grasso (Aiello et al., 1984).

La chetosi di tipo II, o secondaria, si manifesta nelle prime fasi del post-parto, prima del picco di lattazione, ed è tipicamente associata alla presenza di lipidosi epatica (Oetzel, 2004). Questa condizione è caratterizzata da un'elevata mobilizzazione lipidica, con conseguente aumento delle concentrazioni plasmatiche di NEFA, che vengono captati in grande quantità dal fegato (Saradhi et al., 2024). Tuttavia, a differenza della chetosi di

tipo I, la gluconeogenesi e la chetogenesi non sono completamente attive, a causa di uno stato di iperinsulinemia e insulino-resistenza che può precedere la comparsa dei segni clinici (Oetzel, 2004). In queste condizioni, una quota significativa di NEFA non viene ossidata nei mitocondri, ma viene esterificata nel citosol a formare trigliceridi. Poiché nel bovino la capacità epatica di sintetizzare e secernere lipoproteine per il trasporto dei trigliceridi al di fuori del fegato (VLDL) è limitata, soprattutto nel periodo di transizione, i trigliceridi tendono ad accumularsi nel fegato, determinando lo sviluppo di lipidosi epatica (Toscano et al., 2023).

La chetosi secondaria è caratterizzata da concentrazioni di corpi chetonici inferiori rispetto alla forma di tipo I, ma da un quadro clinico più complesso e meno responsivo alla terapia. Tale condizione è riconducibile alla compromissione della funzionalità epatica conseguente all'eccessivo accumulo di lipidi, che determina alterazioni del metabolismo generale, riduzione della risposta immunitaria e minore efficacia degli interventi terapeutici (Melendez and Serrano, 2024).

La chetosi di tipo III è definita una chetosi alimentare; tale condizione si verifica quando viene conferita una razione troppo energetica che esita in un'aumentata produzione ruminale di butirrato, fonte di corpi chetonici (Constable et al., 2017).

I metaboliti circolanti, in particolare NEFA e BHB, sono ampiamente utilizzati come indicatori dello stato di NEB e della chetosi nelle vacche durante il periodo di transizione. Sebbene un moderato aumento delle loro concentrazioni sia considerato fisiologico nelle prime fasi della lattazione, valori più elevati possono indicare una condizione metabolica patologica (Ospina et al., 2010).

Concentrazioni più elevate di BHB nelle prime due settimane dopo il parto sono risultate associate ad una riduzione della produzione latte, ad un aumento percentuale di grasso nel latte e ad una riduzione della percentuale di proteine nel latte. Concentrazioni più elevate di BHB nelle prime due settimane dopo il parto sono risultate associate ad una riduzione della produzione latte, ad un aumento percentuale di grasso nel latte e ad una riduzione della percentuale di proteine nel latte (Duffield, 2000).

La diagnosi della chetosi nelle bovine da latte si basa principalmente sulla determinazione delle concentrazioni di corpi chetonici nei principali fluidi corporei, in particolare del BHB nel sangue, nelle urine o nel latte. L'aumento delle concentrazioni di BHB rappresenta il principale indicatore diagnostico, con valori sierici superiori a 1,2 mmol/L

comunemente utilizzati come soglia per identificare la condizione patologica (Tatone et al., 2017).

I test urinari per la rilevazione dell'acetoacetato rappresentano un metodo diagnostico semplice, basato sull'utilizzo di strip reattive da inserire nel campione biologico. Tale metodica è non invasiva, facilmente accessibile e presenta una sensibilità moderata (96%); tuttavia, è caratterizzata da una bassa specificità (49-59%) ed è influenzata dallo stato di idratazione dell'animale (Constable et al., 2017).

I test sul latte si basano sull'impiego di strip reattive oppure sulla spettrometria ad infrarossi. Si tratta di una metodica non invasiva e di facile esecuzione, sebbene più costosa rispetto al test urinario. Presenta una bassa sensibilità ma un'elevata specificità, risultando pertanto particolarmente utile come strumento di screening precoce (Gruber et al., 2023).

La metodica più attendibile per la diagnosi di chetosi in campo è rappresentata dalla determinazione del BHB nel sangue, considerato il biomarcatore più efficace per l'individuazione della chetosi subclinica nelle bovine nel periodo post-partum. Tale valutazione viene effettuata mediante dispositivi portatili dotati di strip reattive, che consentono una misurazione rapida su una singola goccia di sangue, con elevata sensibilità e specificità (Loiklung et al., 2022).

Tuttavia, è importante considerare che la concentrazione di BHB nel sangue si basa generalmente su un singolo campione e riflette lo stato metabolico dell'animale esclusivamente nel momento del prelievo (Benedet et al., 2019).

Il monitoraggio del BHB ematico nelle prime fasi di lattazione permette di stimare la prevalenza della patologia a livello della mandria e di intervenire precocemente nei soggetti con valori superiori a 1,2 mmol/L per evitare un'ulteriore progressione della chetosi (Tatone et al., 2017).

Gli obiettivi del trattamento della chetosi sono stimolare la gluconeogenesi, aumentare il glucosio plasmatico e diminuire la lipolisi del tessuto adiposo al fine di ristabilire l'equilibrio energetico dell'animale e ridurre la produzione di corpi chetonici (Piantoni and Allen, 2015).

Le opzioni terapeutiche immediate nei casi più gravi prevedono la somministrazione endovenosa di destrosio, il quale consente un rapido incremento della glicemia ed una

riduzione del livello di chetoni. La sua efficacia è temporanea con durata inferiore alle 12 ore (McArt et al., 2012).

La somministrazione orale di glicole propilenico, in particolare nelle forme di chetosi subclinica, consente di ridurre la produzione di corpi chetonici nel corso di alcuni giorni e di aumentare le concentrazioni ematiche di glucosio e insulina, determinando al contempo un miglioramento delle performance riproduttive, produttive e dello stato immunitario (Murray et al., 2006).

In alcune circostanze, possono essere inoltre essere impiegati corticosteroidi per stimolare l'appetito e l'attività metabolica, associati ad integrazioni di vitamina B12, elettroliti e mangimi ad elevata densità energetica, al fine di favorire il recupero dell'animale e il ripristino dell'equilibrio energetico (Kahn et al., 2015). Nei casi associati a processi infiammatori si utilizzano farmaci antinfiammatori non steroidei (Roche et al., 2015).

Ulteriori approcci terapeutici prevedono l'impiego di integrazioni nutrizionali mirate. In particolare, il supplemento di cobalamina può risultare utile in quanto la sua sintesi e il suo assorbimento risultano ridotti in corso di chetosi (Peek and Drivers, 2018).

Anche la metionina svolge un ruolo rilevante, promuovendo la sintesi delle VLDL e facilitando l'esportazione dei trigliceridi dal fegato nel periodo post-partum. Analogamente la carnitina favorisce la β -ossidazione degli acidi grassi a lunga catena e contribuisce a limitare l'accumulo lipidico a livello epatico (Saradhi et al., 2024).

La prevenzione della chetosi riveste un ruolo fondamentale e si basa principalmente su un'adeguata gestione nutrizionale e sul controllo del NEB nel periodo di transizione (Melendez et al., 2004). È essenziale garantire un apporto energetico adeguato, favorire l'ingestione di sostanza secca e mantenere un corretto punteggio di BCS al parto. Un BCS al parto maggiore a 3,5 su 5 è associato ad una maggiore predisposizione allo sviluppo di chetosi e lipidosi epatica (Roche et al., 2009).

Diversi studi hanno evidenziato come l'accorciamento o l'eliminazione del periodo di asciutta possano favorire un miglior adattamento metabolico post-partum, riducendo il rischio di insorgenza della patologia nella fase iniziale della lattazione (Mayasari et al., 2017). Parallelamente, l'adozione di adeguate strategie nutrizionali volte a limitare il deficit energetico e la mobilizzazione lipidica risulta essenziale per il controllo della chetosi (Caixeta and Omontese, 2021).

2.2 Lipidosi epatica

La lipidosi epatica (*hepatic lipidosis* - HL), nota anche come fegato grasso o sindrome della vacca grassa, rappresenta una patologia metabolica tipica delle bovine da latte, che si manifesta prevalentemente nelle prime settimane di lattazione, sebbene possa insorgere anche nel periodo periparto. Tale condizione è strettamente correlata al NEB, che caratterizza l'inizio della lattazione ed inoltre è strettamente associata alla chetosi (Grummer, 1993).

In risposta a questo squilibrio energetico, si verifica un'intensa mobilitazione del tessuto adiposo, con conseguente incremento delle concentrazioni ematiche di NEFA (Gross et al., 2013). Quando la capacità del fegato di ossidare o esportare tali lipidi risulta insufficiente rispetto al loro afflusso, essi vengono accumulati sotto forma di TAGs all'interno degli epatociti. Il contenuto di TAGs a livello epatico non è correlato alla loro sintesi, quanto piuttosto è modulato dalla capacità del fegato stesso di eliminare le VLDL, lipoproteine prodotte dal fegato adibite al trasporto di trigliceridi e colesterolo ai tessuti periferici (Drackley, 1999) (Figura 4). La lipidosi è una patologia che si manifesta prevalentemente nelle prime quattro settimane dopo il parto, quando fino al 50% di tutte le vacche presenta un accumulo di TAGs nel fegato. Le stime di HL dopo il parto, indicano che fino al 10% delle bovine da latte presenta un'infiltrazione epatica grave e fino al 40% un fegato grasso moderato (Jorritsma et al., 2003).

Figura 4: Rappresentazione schematica della mobilizzazione lipidica durante il bilancio energetico negativo (Negative Energy Balance, NEB) nella bovina da latte. La ridotta disponibilità di energia induce la lipolisi del tessuto adiposo con rilascio di acidi grassi non esterificati (NEFA) nel circolo ematico. I NEFA vengono captati principalmente dal fegato, dove possono essere ossidati per la produzione di energia e corpi chetonici, re-esterificati in trigliceridi (TG) con conseguente sviluppo di lipidosi epatica, oppure esportati come lipoproteine a densità molto bassa (VLDL). I NEFA e le VLDL rappresentano inoltre importanti fonti di acidi grassi per la ghiandola mammaria, contribuendo alla sintesi del grasso del latte, mentre i corpi chetonici vengono utilizzati come substrato energetico dai tessuti periferici.

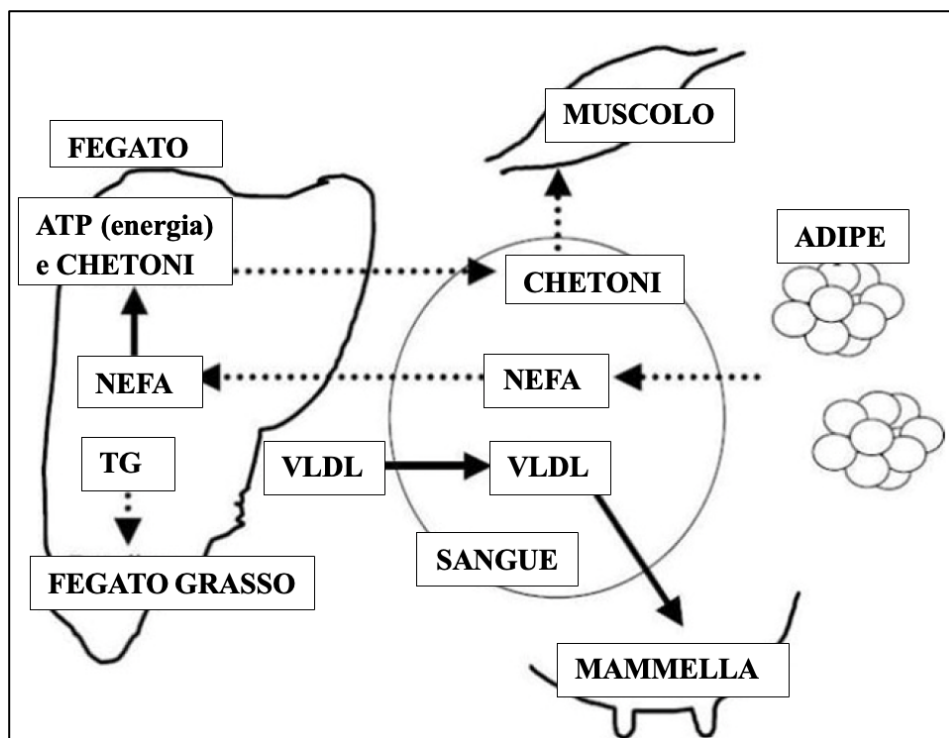


Immagine tratta da Bezerra et al., 2014.

La HL non rappresenta esclusivamente una condizione acuta tipica delle prime fasi della lattazione nelle bovine da latte sottoposte ad un deficit energetico transitorio, ma determina anche effetti persistenti sull'adattamento fisiologico dell'animale (Gross et al., 2013). La produzione latte, le performance riproduttive e lo stato sanitario delle bovine possono rimanere compromessi per diverse settimane, anche successivamente al ritorno delle concentrazioni di TAGs epatici ai valori basali (Starke et al., 2010).

La HL può essere definita sulla base della percentuale di TAGs a livello epatico associata ad una riduzione dello stato di salute, del benessere, della produttività o delle prestazioni riproduttive. La classificazione della HL è descritta nella Tabella 1.

Tabella 1: Classificazione della lipidosi epatica (Hepatic Lipidosis, HL) nella bovina da latte in base alla concentrazione di trigliceridi (TAG) nel fegato, espressa come percentuale del peso umido dell'organo. La tabella riporta le quattro categorie di gravità (normale, lieve, moderata e grave) e la loro associazione con la presenza di corpi chetonici nelle urine, l'ingestione di alimento, la produzione di latte, le performance riproduttive e le principali alterazioni morfologiche del fegato. All'aumentare dell'accumulo di TAG epatici si osserva un progressivo peggioramento dello stato metabolico, della funzionalità epatica e delle performance produttive e riproduttive.

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

¹TAG = triacylglycerol.
²The symbols + and – mean positive and negative association, respectively, and the number of symbols represents slight, moderate, or strong association; 0 means no association.

Tabella tratta da Bobe et al., 2004

In letteratura sono descritti diversi strumenti clinici e diagnostici utili alla classificazione della HL in forma lieve, moderata e grave (González et al., 2011).

Tra i principali indicatori biochimici si riscontrano, in corso di lipidosi, un aumento delle concentrazioni sieriche degli enzimi epatici AST e GGT, una riduzione dei livelli di colesterolo, iperbilirubinemia, elevate concentrazioni di NEFA, ridotti livelli di glicemia e urea nelle prime fasi di lattazione e un incremento di BHB (Du et al., 2018).

Questi tradizionali profili biochimici epatici, pur essendo molto utilizzati, presentano importanti limitazioni diagnostiche. L'aumento registrato degli enzimi epatici e di altri metaboliti si verifica generalmente quando il danno epatico è già in fase avanzata, riducendo significativamente la possibilità di intervento precoce ed efficace (Melendez et al., 2018).

Alla luce di queste considerazioni, emerge chiaramente la necessità di anticipare la diagnosi rispetto alla comparsa dei segni clinici e delle alterazioni biochimiche al fine di consentire l'adozione tempestiva di strategie terapeutiche e preventive con l'obiettivo di limitare il danno epatico, migliorare lo stato metabolico dell'animale e ottimizzare le performance produttive della mandria (Melendez and Pinedo, 2024).

L'estrazione del grasso tramite biopsia risulta la tecnica diagnostica gold standard per la determinazione istologica dei TAGs epatici. È una metodica molto accurata ma presenta

molti limiti dal punto di vista dell'applicabilità in campo, in quanto richiede tempo per l'acquisizione del campione e per l'analisi (Starke et al., 2010).

Le biopsie epatiche inoltre sono invasive, dolorose per l'animale e associate a rischi di emorragia, infezione e aderenze (Swecker, 2014).

L'ecografia transcutanea rappresenta un'ulteriore tecnica diagnostica per l'identificazione di HL; tuttavia, essa presenta una sensibilità limitata nei casi in cui il contenuto epatico di TAGs sia inferiore al 10%. Questa metodica risulta maggiormente affidabile nella diagnosi delle forme più gravi di HL caratterizzate da un contenuto di TAGs superiore al 10% (Starke et al., 2010). La citologia da agoaspirato rappresenta una tecnica diagnostica recentemente rivalutata, caratterizzata da una minima invasività, basso costo e rapida esecuzione rispetto alla biopsia. Tale tecnica mostra un'accuratezza diagnostica soddisfacente (sensibilità del 73% e specificità dell'85%) e consente l'identificazione precoce della lipidosi, anche nelle fasi iniziali caratterizzate da un'infiltrazione lipidica compresa tra il 2-5% (Melendez et al., 2018).

Il trattamento della HL nella bovina da latte varia in funzione della gravità della condizione (Bobe et al., 2004). Questo, insieme alla prevenzione si basano sostanzialmente sugli stessi accorgimenti attuati per la gestione della chetosi, ovvero la riduzione del grado di lipolisi, la riduzione delle concentrazioni ematiche di NEFA, il miglioramento dell'ossidazione dei NEFA da parte del fegato e l'aumento della clearance epatica di TAGs (Grummer, 1993). La prevenzione, dunque, rappresenta l'approccio più efficace per il controllo della patologia; in particolare, risulta fondamentale adottare strategie nutrizionali e gestionali mirate durante il periodo di transizione (LeBlanc et al., 2006).

La formulazione di razioni adeguatamente bilanciate, il monitoraggio del BCS e il mantenimento di un adeguato stato sanitario dell'animale rappresentano i tre pilastri fondamentali per la gestione della patologia (LeBlanc, 2010).

3. Principi fondamentali di diagnostica ecografica

L'ecografia è una tecnica di diagnostica per immagini non invasiva, sicura e di rapida esecuzione, caratteristiche che ne consentono l'impiego anche in condizioni di campo (Braun and Krüger, 2013). In medicina veterinaria bovina rappresenta uno strumento essenziale, inizialmente impiegato quasi esclusivamente per lo studio dell'apparato riproduttivo, ma oggi ampiamente utilizzato anche per l'esplorazione di altri organi e apparati sia nel vitello sia nel bovino adulto (Streeter and Step, 2007).

Negli ultimi decenni, il suo impiego si è notevolmente ampliato, rendendola una metodica di riferimento nella pratica clinica. Questa tecnica diagnostica rispetto alla radiologia offre il vantaggio di una maggiore risoluzione di contrasto e della possibilità di ottenere immagini in tempo reale su diversi piani, grazie anche all'utilizzo di dispositivi portatili (Blond and Buczinski, 2009).

L'ecografia è una tecnica di diagnostica per immagini basata sulla trasformazione delle onde sonore in segnali visivi. Essa utilizza una sonda che emette ultrasuoni e riceve degli echi di ritorno generati dall'interazione delle onde con i tessuti: sono proprio questi echi e non le onde emesse, ad essere elaborati da un sistema computerizzato e convertiti in immagine (Spattini, 2008).

Gli ultrasuoni (US) sono onde sonore di natura meccanica caratterizzate da frequenze superiori al limite di udibilità umana (20KHz). In ambito ecografico si impiegano frequenze molto più elevate, generalmente comprese tra i 2 e 10 MHz. Tali onde si propagano nei diversi mezzi a velocità variabile, ad esempio 340 m/s nell'aria e 1840 m/s nell'acqua, e sono caratterizzate da movimento vibratorio periodico ad alta frequenza che consentono la formazione dell'immagine ecografica (Fulton, 2014).

Gli US necessitano di un mezzo per propagarsi: tra i tessuti, i fluidi sono il mezzo migliore per la loro propagazione, mentre l'osso e i gas sono una vera e propria barriera acustica (Leighton, 2007).

Le onde ultrasonore sono caratterizzate da specifici parametri fisici fondamentali, tra cui la lunghezza d'onda (λ), la frequenza (f), la velocità di propagazione (v), l'intensità e l'attenuazione, quest'ultima influenzata dall'impedenza acustica del mezzo attraversato (Blond and Buczinski, 2009).

La lunghezza d'onda è definita come la distanza tra due punti massimi o minimi di oscillazione di una funzione sinusoidale. Negli US essa si colloca in un range compreso tra 1,5 e 1 nm (Lawrence, 2007).

La frequenza, espressa in Herz (Hz), rappresenta il numero di oscillazioni per unità di tempo. In ambito ecografico, le sonde utilizzate operano generalmente a frequenze comprese tra 2 e 10 MHz. La frequenza riveste un ruolo determinante nella qualità dell'indagine ecografica, in quanto condiziona sia la capacità di penetrazione degli ultrasuoni nei tessuti sia la risoluzione dell'immagine ottenuta (Aldrich, 2007).

In particolare, frequenze più basse permettono di raggiungere strutture situate a maggiore profondità, ma con una riduzione della definizione dell'immagine; al contrario, frequenze più elevate garantiscono un maggior dettaglio, pur limitando la profondità di penetrazione (Leighton, 2007).

Di conseguenza, la scelta della sonda deve essere effettuata in funzione della distanza della struttura da esaminare rispetto alla superficie cutanea. Indicativamente, una sonda da 7,5 MHz consente una penetrazione di 4-6 cm, una da 5 MHz di 10-12 cm, una da 3,5 MHz di 15-20 cm e una da 2,5 MHz fino a 25-35 cm (Andualem et al., 2017).

La velocità di propagazione dell'onda è determinata dal prodotto tra frequenza e lunghezza d'onda, secondo la relazione:

$$v = f \cdot \lambda$$

La velocità di propagazione degli US dipende dalle caratteristiche fisiche del mezzo attraversato, in particolare dalla sua densità ed elasticità. Il prodotto tra la densità del mezzo e la velocità dell'onda definisce l'impedenza acustica, parametro fondamentale che esprime la resistenza del mezzo alla trasmissione delle onde sonore (Laugier and Haïat, 2011).

Durante la propagazione nei tessuti biologici, gli US vengono parzialmente trasmessi in profondità, riflessi verso il trasduttore, dispersi o trasformati in calore. Ai fini della formazione dell'immagine ecografica, risultano essenziali gli echi riflessi, la cui intensità dipende dalla differenza di impedenza acustica tra i tessuti (Meola, 2008).

In particolare, quando un fascio US incontra un'interfaccia tra mezzi con diversa impedenza acustica, una parte dell'onda viene riflessa in misura proporzionale alla differenza tra i due mezzi. In corrispondenza delle interfacce acustiche hanno luogo fenomeni di riflessione e di diffusione necessari alla formazione dell'immagine ecografica (Aldrich, 2007).

Le interfacce acustiche tra tessuti con impedenze simili, per esempio tessuto molle-tessuto molle o tessuto molle-liquido, favoriscono una parziale riflessione degli US, pari all'1%, associata ad una diffusione del fascio primario (99%) alle strutture sottostanti. Quando invece la differenza di impedenza acustica tra tessuto è marcata, tessuto molle-osso oppure tessuto molle-aria, poiché vi è una grande differenza di velocità di propagazione dell'onda tra di essi, si verifica la totale riflessione del fascio, che non riesce a proseguire oltre (Spattini, 2008).

In particolare, quando l'onda US incontra l'aria viene totalmente riflessa, mentre quando incontra l'osso una parte è riflessa e una grossa parte è assorbita, ma non c'è diffusione negli strati più profondi (Meola, 2008).

Nell'attraversare il paziente, il fascio di ultrasuoni viene attenuato a causa delle sue interazioni con i tessuti. Le principali interazioni dell'onda sonora con il mezzo di trasmissione sono: riflessione, rifrazione, diffusione e assorbimento (Patey and Corcoran, 2021). La riflessione si verifica quando le onde US incontrano un'interfaccia tra tessuti caratterizzati da diversa impedenza acustica, determinando il ritorno verso la sonda di una quota dell'energia incidente e la conseguente formazione dell'eco. Le interfacce piane, di dimensioni maggiori rispetto alla lunghezza d'onda e con incidenza prossima alla perpendicolarità, si comportano come riflettori speculari, generando echi intensi che appaiono all'immagine ecografica come linee o punti iperecogeni.

La rifrazione consiste nella deviazione della direzione di propagazione dell'onda US quando attraversa un'interfaccia tra tessuti caratterizzati da diversa velocità di trasmissione del suono; tale fenomeno dipende esclusivamente dalla variazione di velocità e non dalle differenze di impedenza acustica (Martin, 2019).

Quando il fascio incide obliquamente sull'interfaccia, parte dell'energia viene riflessa con un angolo uguale a quello di incidenza, mentre la componente trasmessa subisce una deviazione dalla traiettoria originaria. Questo comporta una riduzione dell'energia che ritorna alla sonda e rappresenta una delle principali cause di artefatti nell'immagine ecografica (Patey and Corcoran, 2021).

La diffusione, o scattering, si verifica quando un fascio ultrasonoro incontra superfici irregolari o molteplici piccole superfici orientate in modo diverso, tali per cui il fascio diffonde in tutte le direzioni (Streeter and Step, 2007).

L'assorbimento consiste nella trasformazione dell'energia acustica del fascio ultrasonoro in energia termica durante l'attraversamento dei tessuti, rappresentando circa l'80% dei

fenomeni responsabili dell'attenuazione dell'immagine. Tale processo è più marcato nei tessuti ad alta densità, come l'osso, rispetto i tessuti molli (Kossoff, 2000).

Gli US sono generati da cristalli piezoelettrici contenuti nel trasduttore della sonda ecografica. Questi cristalli, sottoposti ad impulsi elettrici, vibrano producendo onde sonore ad alta frequenza che si propagano nei tessuti. L'interazione tra le onde ultrasonore e le diverse strutture biologiche determina la produzione di echi di ritorno, i quali vengono nuovamente captati dal trasduttore (Fulton, 2014).

Qui gli echi inducono una nuova vibrazione dei cristalli piezoelettrici, generando segnali elettrici, che opportunamente amplificati ed elaborati dal sistema centrale, vengono convertiti in immagini ecografiche (Blond and Buczinski, 2009).

La modalità di scansione più utilizzata in Medicina Veterinaria è il Real-Time Brightness mode (B-mode), che fornisce immagini bidimensionali in scala di grigi. Ogni pixel dell'immagine è caratterizzato da una determinata brillantezza, direttamente proporzionale all'intensità degli echi ricevuti. Le immagini risultanti sono monocromatiche: il bianco rappresenta echi ad alta intensità, il nero indica assenza di echi, mentre le diverse tonalità di grigio (gray scale) corrispondono a livelli intermedi di riflessione (Fontes and Oosthuizen, 2022).

La maggiore o minore ecogenicità, corrispondente alla minore o maggiore quantità degli echi di ritorno (e alla loro intensità), è valutabile attraverso la brillantezza dell'immagine sul monitor. Si possono avere fisiologicamente parenchimi iperecogeni (maggiore riflessione degli echi, quindi più chiari), altri ipoecogeni (minore riflessione, quindi più scuri) o anecogeni (assenza di echi, quindi neri), ma anche parenchimi che patologicamente diventano più ecogeni o meno ecogeni (Martin, 2019).

I tessuti dell'organismo presentano un gradiente crescente di ecogenicità che, in condizioni fisiologiche, segue generalmente il seguente ordine:

- Fluido
- Muscolo
- Corticale renale
- Fegato
- Grasso
- Milza
- Osso

(Fontes and Oosthuizen, 2022).

L'apparecchio ecografico è costituito essenzialmente da una sonda (trasduttore), un sistema centrale di elaborazione e un monitor, che consente la visualizzazione in tempo reale delle immagini ottenute.

La classificazione più importante delle sonde è quella sulla base del tipo di immagine ultrasonografica che la sonda produce, comprendendo sonde settoriali, lineari e trapezoidali (Szabo and Lewin, 2013).

Le sonde ecografiche si distinguono principalmente in base alla geometria del fascio US e al campo di vista (field of view), influenzando così l'applicabilità clinica nelle diverse indagini diagnostiche (Jankovic and Peng, 2004).

Le sonde settoriali sono caratterizzate da linee di scansione divergenti a partire da un punto di origine, generando un'immagine a forma di piramide (Figura 5). Presentano un near field molto ridotto e un far field ampio che la rende particolarmente adatte all'ecocardiografia (Rizzatto, 1998).

Figura 5: Esempi di sonde ecografiche settoriali e lineari impiegate in medicina veterinaria. Le sonde settoriali generano un fascio divergente e un'immagine a ventaglio, risultando adatte all'esame di strutture profonde o localizzate tra gli spazi intercostali. Le sonde lineari producono invece un fascio parallelo e un'immagine rettangolare, garantendo elevata risoluzione per la valutazione di strutture superficiali, tessuti molli, tendini, mammella e apparato muscoloscheletrico.

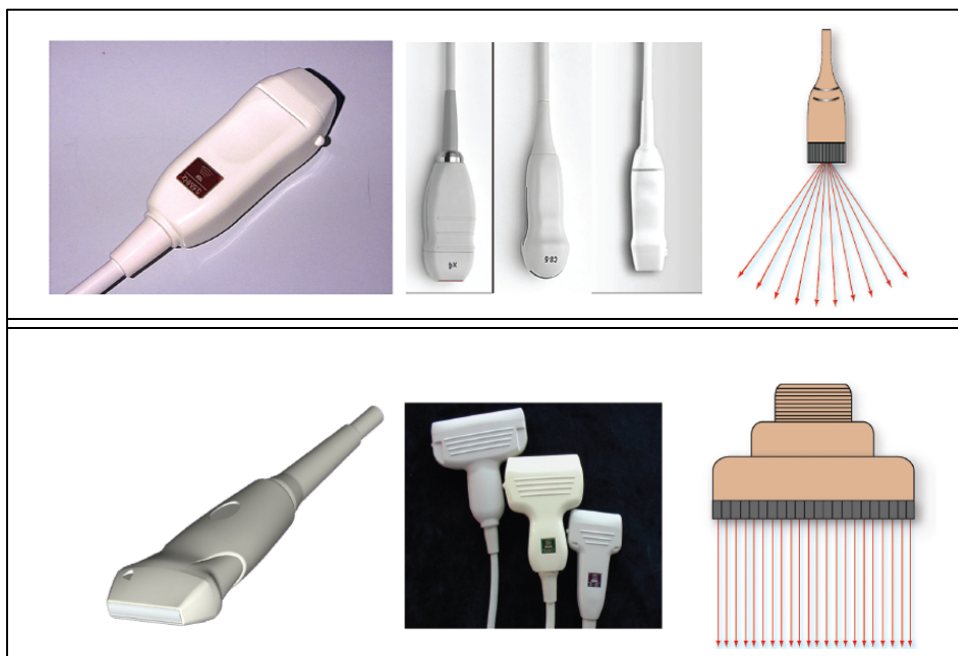


Immagine tratta da Meola, 2008

Le sonde lineari producono immagini rettangolari, con linee di scansione parallele tra loro e un near field esteso. Offrono un'elevata risoluzione superficiale e vengono impiegate soprattutto in applicazioni che richiedono elevato dettaglio anatomico. Le sonde a bassa frequenza (3,5-5 MHz) trovano impiego nella ginecologia dei grossi animali e in ortopedia, mentre quelle ad alta frequenza (7,5-10 MHz) sono utilizzate per lo studio delle strutture superficiali (Blond and Buczinski, 2009).

Le sonde trapezoidali (convex o curvilinear) rappresentano un'evoluzione delle sonde lineari e presentano una superficie convessa che consente di ottenere un'immagine intermedia tra quella lineare e quella settoriale. Il near field risulta più ampio rispetto alle sonde settoriali, mentre il far field è progressivamente divergente (Fulton, 2014).

Tutte le sonde ecografiche presentano un marker che consente il corretto orientamento dell'immagine e deve corrispondere al riferimento visualizzato sul monitor. Per convenzione, al fine di ottenere immagini standardizzare, durante la scansione longitudinale il marker della sonda viene orientato in direzione craniale del paziente e viene visualizzato sul lato sinistro dello schermo. Nella scansione trasversale, invece, la sonda viene ruotata di 90 gradi e il marker è diretto verso il lato sinistro del paziente, mantenendo la corrispondenza con il riferimento sul monitor (Lisciandro, 2013).

3.1 Principali artefatti ecografici

In ecografia, un artefatto è definito come un elemento presente nell'immagine che non corrisponde ad una reale caratteristica strutturale del soggetto esaminato, determinando una rappresentazione distorta o alterata della realtà anatomica (Kremkau and Taylor, 1986).

Gli artefatti sono costantemente presenti nelle immagini ecografiche e il loro riconoscimento è fondamentale per evitare errori interpretativi e conseguenti diagnosi scorrette (Spattini, 2008).

Gli artefatti ecografici possono essere classificati in diverse categorie: artefatti di natura ambientale, legati ad esempio ad interferenze elettromagnetiche; artefatti operatore-dipendenti, dovuti ad impostazioni non corrette dell'apparecchiatura o una preparazione inadeguata del paziente; artefatti generati dall'interazione tra il fascio US e i tessuti; e artefatti riconducibili al funzionamento dell'ecografo (Blond and Buczinski, 2009). Tali artefatti possono determinare la visualizzazione di strutture non reali, l'impossibilità di identificare alcune componenti anatomiche, un'apparente variazione dell'ecogenicità e alterazioni di forma, dimensione e posizione delle strutture osservate. In ambito diagnostico, essi possono rappresentare sia un limite, in quanto in grado di mascherare o distorcere l'immagine reale, sia un utile supporto, contribuendo alla caratterizzazione di specifiche condizioni patologiche (Wang et al., 2023).

Gli artefatti di natura ambientale sono principalmente dovuti ad interferenze elettromagnetiche generate da apparecchiature presenti nelle vicinanze. Possono manifestarsi con modalità differenti e la loro eliminazione richiede generalmente la rimozione della fonte di interferenza o lo spostamento dell'esame in un ambiente idoneo (Littmann, 2021).

Gli artefatti operatore-dipendenti comprendono invece condizioni legate alla preparazione del paziente, alla tecnica di esecuzione e al corretto utilizzo dei parametri dell'ecografo. Tra i più frequenti rientrano quelli dovuti ad una preparazione inadeguata, in cui la mancata tricotomia, una scarsa detersione o un insufficiente utilizzo del gel determinano la presenza di aria tra sonda e cute, ostacolando la trasmissione degli US e compromettendo la qualità dell'immagine (Lisciandro, 2013).

Un'ulteriore causa è rappresentata dall'errata inclinazione della sonda: per ottenere una corretta visualizzazione, il fascio ultrasonoro deve incidere perpendicolarmente sulla

struttura; inclinazioni eccessive comportano la dispersione degli US e la comparsa di aree artificialmente ipoecogene (Vargas et al., 2008).

Infine, un ruolo rilevante è svolto dall'impostazione non corretta dei parametri dell'apparecchio, in particolare potenza e guadagno. La potenza regola l'intensità del fascio ultrasonoro e dovrebbe essere mantenuta al livello minimo necessario per evitare un'eccessiva interazione con i tessuti superficiali e la perdita della normale scala di grigi. Il guadagno, invece, determina l'amplificazione degli echi di ritorno: valori elevati producono immagini sovra sature e con scarso contrasto, mentre valori troppo bassi riducono la visibilità dei dettagli (Grogan and Mount, 2023; Hindi et al., 2013).

Gli artefatti ecografici derivanti dall'interazione tra US e tessuti comprendono principalmente la riverberazione, l'ombra acustica posteriore, l'effetto specchio e le ombre acustiche laterali da rifrazione (Spattini, 2008).

- L'artefatto da riverbero si verifica quando il fascio ultrasonoro incontra una superficie altamente riflettente, come gas, osso o strutture calcificate, e viene riflesso ripetutamente tra il tessuto e il trasduttore. Questo fenomeno genera una serie di linee iperecogene parallele, equidistanti e con intensità progressivamente decrescente (Prabhu et al., 2014). Due varianti tipiche sono la Comet Tail, che si osserva in presenza di piccole superfici riflettenti come bolle di gas, e il Ring Down Artifact, che si verifica quando il fascio US investe formazioni o raccolte a contenuto in parte gassoso ed in parte liquido. I due artefatti hanno la stessa manifestazione visiva, la differenza è che, mentre la coda di cometa è statica, il Ring down artifact è mobile (Hindi et al., 2013).
- L'ombra acustica posteriore (cono d'ombra) si forma distalmente a strutture fortemente riflettenti o assorbenti, come osso, gas o corpi estranei, che impediscono la propagazione del fascio ultrasonoro, determinando l'assenza di echi di ritorno, dietro la struttura (Muça et al., 2021).
- L'effetto specchio si verifica in presenza di strutture poste in vicinanza ad interfacce altamente riflettenti e generalmente curvilinee, che determinano la duplicazione speculare di una struttura al di là della superficie riflettente, come avviene tipicamente in prossimità del diaframma (Kerr and Middleton, 2020).
- Le ombre acustiche laterali sono dovute alla rifrazione del fascio US ai margini di strutture curvilinee; la deviazione del fascio impedisce il ritorno degli echi alla

sonda, generando aree di ipoecogenicità laterale, che risultano convergenti nelle strutture liquide e divergenti in quelle solide (Lisciandro, 2013).

Tra gli artefatti generati dall'ecografo rientrano: l'artefatto del campo superficiale, l'artefatto della valutazione della velocità di propagazione, il rinforzo di parete posteriore, l'artefatto da volume parziale e l'artefatto dei lobi laterali (Spattini, 2008).

- L'artefatto del campo superficiale limita la visualizzazione delle strutture immediatamente sottostanti la sonda ed è spesso mitigato mediante l'utilizzo di distanziatori o di adeguati mezzi di accoppiamento (Spattini, 2008).
- L'artefatto di errore della valutazione della velocità di propagazione deriva dall'assunzione, da parte dell'ecografo, di una velocità costante degli US nei tessuti. In realtà, tale velocità varia, in particolare nel tessuto adiposo, causando una rappresentazione alterata della profondità delle strutture, che possono apparire più profonde rispetto alla loro reale posizione (Bönhof, 2017).
- Il rinforzo di parete posteriore è caratterizzato da un aumento dell'ecogenicità delle strutture situate distalmente a raccolte liquide, poiché gli US attraversano i liquidi con minima attenuazione (Bönhof, 2017).
- L'artefatto da volume parziale è dovuto alla rappresentazione bidimensionale di strutture tridimensionali e alla sovrapposizione di tessuti con diversa ecogenicità, generando immagini con caratteristiche intermedie, come il così detto pseudo-sedimento in cavità liquide. Tale artefatto risulta visibile in vescica e in cistifellea (Blond and Buczinski, 2009).
- L'artefatto dei lobi laterali è legato alla presenza di fasci US secondari che, pur avendo minore intensità rispetto al fascio principale, generano echi erroneamente attribuiti al fascio primario e visualizzati al centro dell'immagine. Questo artefatto è più evidente in presenza di strutture anecogene e può essere ridotto mediante la diminuzione del guadagno (Lisciandro, 2013).

4. Ecografia Epatica

L'esame ecografico rappresenta una tecnica non invasiva di fondamentale importanza nei bovini da latte per la valutazione dello stato di salute del fegato (Braun, 2009).

Esso riveste un ruolo fondamentale nella diagnosi delle principali patologie epatiche nei ruminanti, tra cui HL, ascessi epatici, fascioliasi e trombosi della vena cava caudale (CVC) (Streeter and Step, 2007).

L'esplorazione ecografica viene effettuata sul lato destro dell'addome, a livello laterale e ventrale, in corrispondenza dell'inserzione diaframmatica; Tale esplorazione viene effettuata estendendosi dal dodicesimo al quinto-settimo spazio intercostale in senso dorso-ventrale, procedendo caudo cranialmente, concentrandosi in particolare negli spazi dal dodicesimo al decimo (Braun and Krüger, 2013).

L'esatta posizione dell'organo varia da animale ad animale in base alla replezione dell'apparato gastro-enterico e ad un'eventuale gravidanza in corso. L'organo viene esplorato mediante scansioni nei piani sagittale e trasversale, al fine di ottenere una valutazione completa e una ricostruzione tridimensionale della struttura esaminata (Braun, 2009). Nei bovini adulti, per una corretta visualizzazione del margine viscerale del fegato e della CVC, si utilizzano sonde a bassa frequenza (2,5-3,5 MHz). Una parte del lobo epatico sinistro può non essere visualizzabile a causa della sovrapposizione del parenchima polmonare (Streeter and Step, 2007).

La preparazione del paziente rappresenta una fase essenziale dell'esame ecografico e prevede la rimozione del pelo dell'area di interesse, seguita dalla detersione della cute mediante acqua o alcol (Rantanen and Ewing, 1981).

Tuttavia, nei bovini la tricotomia può rappresentare un limite pratico, sia per motivi estetici ed economici, sia per il maggiore impiego richiesto. Si procede quindi con l'applicazione di alcol che consente di ottimizzare il contatto tra sonda e superficie cutanea, migliorando la trasmissione degli US (Blond and Buczinski, 2009).

L'esame ecografico permette di valutare la localizzazione, le dimensioni e le caratteristiche del parenchima epatico, oltre alla topografia dei principali vasi intraepatici come mostrato in figura 6 (Braun, 2009).

In condizioni fisiologiche, il pattern ecografico epatico è omogeneamente ipoecogeno e forma un angolo acuto centrato sulla CVC. La profondità epatica, in condizioni normali, può raggiungere valori di circa 15 cm (Fiore et al., 2018).

Le vene epatiche risultano apprezzabili all'interno del parenchima e mostrano un incremento progressivo del diametro in direzione della vena porta (PV) e della CVC, con lume anecogeno (Taio et al., 2025).

La PV, per effetto della sua ramificazione, assume un aspetto tipicamente stellato durante i movimenti della sonda e si distingue dalle vene epatiche per la presenza di una parete iperecogena. Essa è situata ventrolateralmente rispetto alla CVC e presenta un diametro compreso tra 2,9 e 5,3 cm negli ultimi due spazi intercostali, con una progressiva riduzione procedendo in senso craniale; Viene localizzata tra il dodicesimo e l'ottavo spazio intercostale (Braun, 2009).

La CVC ha una posizione solitamente dorso-mediale rispetto alla PV e appare in sezione trasversa con una caratteristica forma triangolare; Viene localizzata tra l'undicesimo e il dodicesimo spazio intercostale (Streeter and Step, 2007).

La cistifellea è localizzata sulla superficie viscerale del fegato ed è ecograficamente identificabile generalmente tra il nono e l'undicesimo SI. Si presenta come una struttura cistica, di forma piriforme e con dimensioni variabili, caratterizzata da un contenuto anecogeno e da una sottile parete iperecogena (Braun and Krüger, 2013).

***Figura 6:** Rappresentazione schematica dell'anatomia ecografica dei principali vasi sanguigni del fegato nella bovina, con indicazione delle finestre di scansione a livello degli spazi intercostali. In blu sono rappresentati la vena cava caudale (A) e le vene epatiche (B); in verde la vena mesenterica craniale (C), la vena splenica (D), la vena porta principale (E) e i suoi rami intraepatici (F). La cistifellea (G.B.) è evidenziata in giallo. Le frecce indicano la direzione del flusso ematico, mentre i numeri identificano gli spazi intercostali utilizzati per l'esame ecografico del fegato. La figura costituisce una guida per il corretto posizionamento della sonda e per l'identificazione delle principali strutture vascolari durante l'esplorazione ecografica epatica.*

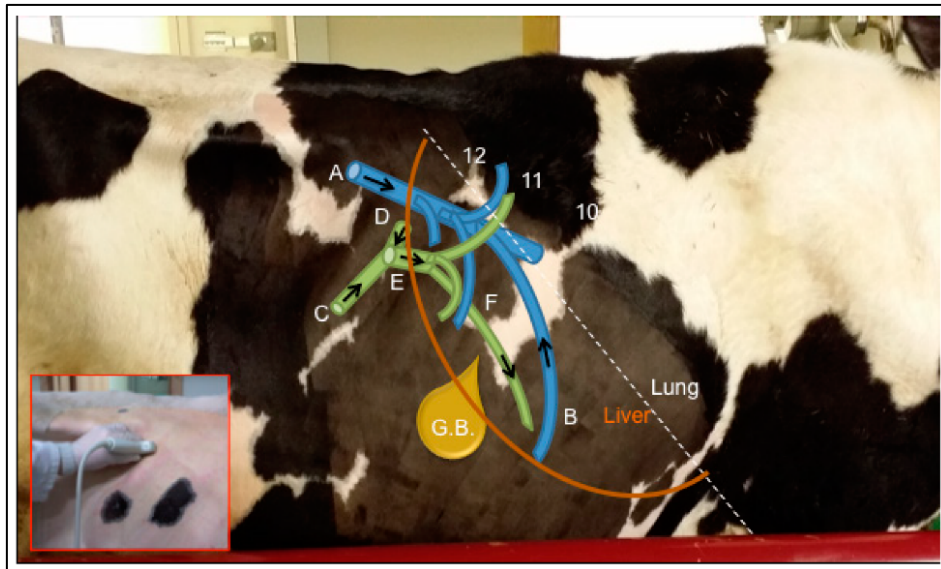


Immagine tratta da Barreiro-Vázquez et al., 2019

Alcune misurazioni possono essere eseguite direttamente sull'immagine ecografica mediante l'impiego di cursori, in modo rapido ed economico sia in soggetti sani sia patologici. A tal fine, è necessario acquisire l'immagine durante il picco inspiratorio dell'animale (Braun, 2009).

Tra i parametri più rilevanti per la valutazione delle alterazioni epatiche rientrano la profondità epatica (LD) e la profondità della vena porta (DPV) (Piazza et al., 2022)

La LD è definita come la distanza tra il limite ventrale del muscolo intercostale interno ed il limite dorsale del tessuto adiposo periviscerale, tracciata attraverso il centro della porta. La DPV è invece rappresentata dalla distanza tra il margine ventrale dell'intero muscolo intercostale e il centro del vaso. Tra gli altri parametri utili rientrano l'angolo epatico e la valutazione del contenuto lipidico (Fiore et al., 2018).

I diametri della CVC e della PV non risultano influenzati da età o razza, ma sono correlati a fattori quali dimensioni corporee, altezza al garrese, produzione latte e stadio di gravidanza (Braun and Gerber, 1994). In particolare, con l'avanzare della gravidanza si osserva un incremento del diametro della CVC, mentre quello della PV tende a ridursi (Braun, 2009). Inoltre, l'ordine di parto risulta associato alle dimensioni epatiche, espresse in termini di LD e DPV, che risultano maggiori nelle bovine pluripare rispetto alle primipare (Braun and Gerber, 1994).

L'ecografia transcutanea rappresenta una metodica non invasiva promettente per la valutazione del rischio e diagnosi di HL nelle bovine da latte ad alta produzione, soprattutto considerando i limiti della biopsia epatica in ambito aziendale (Fiore et al., 2018).

Il pattern ecografico fisiologico del fegato è principalmente determinato dalla presenza di interfacce tra collagene e acqua. L'aumento dell'accumulo lipidico a livello del parenchima epatico determina un incremento del livello di grigio nelle immagini ecografiche, conferendo al fegato un aspetto soggettivamente più brillante (Joseph et al., 1979)

Tuttavia, l'ecografia, pur essendo sensibile nell'identificazione delle alterazioni del parenchima, presenta una bassa specificità diagnostica ed è influenzata da fattori tecnici ed operatore-dipendenti, rendendo talvolta necessaria la conferma mediante esami citologici o istologici (Blond and Buczinski, 2009). Recentemente, diversi studi hanno evidenziato come l'ecografia rappresenti uno strumento efficace per la stima dell'accumulo lipidico epatico nelle bovine durante il periodo di transizione (Banzato et al., 2016)

In particolare, l'associazione tra ecografia in modalità B e software di analisi della texture ha mostrato una forte correlazione con il contenuto di TAGs determinato mediante biopsia (Elshafey et al., 2023). Nonostante quest'ultima costituisca il gold standard per la valutazione dei TAGs, il suo impiego in ambito aziendali risulta limitato, in quanto si tratta di una procedura invasiva, con potenziali affetti avversi (Taio et al., 2025).

Inoltre le modificazioni della texture epatica associate a lipidosi sono spesso lievi e difficilmente rilevabili visivamente, anche a causa dell'elevata variabilità soggettiva (Giannuzzi et al., 2021).

Per migliorare l'accuratezza diagnostica, è fondamentale standardizzare la tecnica ecografica e ricorrere a metodi quantitativi, come la texture analysis, che consentono una

valutazione più oggettiva del contenuto lipidico epatico. Anche parametri morfometrici, quali LD e DPV, possono fornire un utile supporto diagnostico non invasivo (Fiore et al., 2018; Starke et al., 2010).

5. Ecografia dello spessore del grasso dorsale

La misurazione del BFT viene oggi effettuata prevalentemente tramite ecografia. Le tecniche più datate, basate sull'impiego di aghi penetranti la cute, non sono più utilizzate, sebbene abbiano contribuito in modo significativo allo sviluppo e alla validazione delle attuali metodiche di misurazione (Schröder and Staufienbiel, 2006).

L'indagine ecografica rappresenta una metodica rapida, non invasiva e di semplice esecuzione. Per la sua realizzazione è necessario un ecografo portatile in modalità B dotato di una sonda lineare, con frequenza compresa tra 5,0 e 7,5 MHz (Streeter and Step, 2007).

La sonda viene applicata a livello della regione sacrale, mantenendola perpendicolare ad una linea immaginaria tra le tuberosità ischiatiche (*tuber ischii*) e le tuberosità coxali (*tuber coxae*), circa 9-11 cm cranialmente rispetto alle tuberosità ischiatiche (Fiore et al., 2025).

È fondamentale esercitare una pressione minima e mantenere un orientamento ortogonale rispetto all'interfaccia tra tessuto adiposo e muscolare, al fine di evitare la compressione del grasso sottocutaneo. Durante l'esame, l'animale deve essere mantenuto in una posizione naturale e rilassata (Brethour, 1992).

La regione sacrale rappresenta uno dei siti più utilizzati e accurati per la valutazione del BFT, in quanto caratterizzata dalla maggiore quantità di tessuto adiposo e da un'elevata correlazione con il contenuto di grasso corporeo. Inoltre, questa sede è facilmente individuabile e presenta variazioni minime del BFT anche su brevi distanze, rendendola particolarmente affidabile per le misurazioni (Fiore et al., 2020). La Figura 7 riporta un esempio di posizionamento della sonda ecografica per la misurazione del BFT e relativa immagine ecografica.

Figura 7: Esempio di posizionamento della sonda ecografica per la misurazione dello spessore del grasso dorsale (Back Fat Thickness, BFT) (a) e relativa immagine ecografica (b). Nell'immagine b, la freccia arancione identifica la fascia trunci superficiale, mentre la freccia blu indica la fascia trunci profonda. La parentesi quadra arancione delimita lo spessore della cute, mentre la parentesi quadra blu evidenzia il tessuto adiposo sottocutaneo utilizzato per la determinazione del BFT

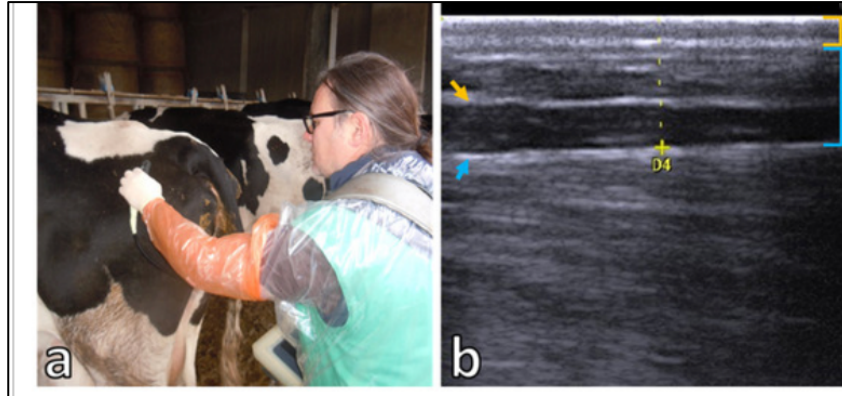


Immagine tratta da Fiore et al., 2025

In tale regione, lo spessore della cute è pari a circa 5-6 mm, mentre la *fascia trunci profunda*, situata immediatamente al di sopra del muscolo gluteo, appare all'esame ecografico come una linea iperecogena ben definita; nella maggior parte dei soggetti è inoltre presente una fascia superficiale, visibile come una sottile linea iperecogena che separa il grasso sottocutaneo da quella interfasciale (Brethour, 1992). Un valore di 6 mm di BFT indica una quasi completa deplezione delle riserve adipose (Schröder and Staufenbiel, 2006). Nella Figure 8 sono riportate le immagini ecografiche di bovine con diversi livelli di riserve corporee (scarse, moderate, elevate).

Figura 8: Immagine ecografiche che evidenziano lo spessore del tessuto adiposo sottocutaneo, compreso tra la fascia superficiale e quella profonda, rappresenta un indicatore oggettivo delle riserve energetiche della bovina e costituisce un valido supporto per la valutazione dello stato nutrizionale durante il periodo di transizione.

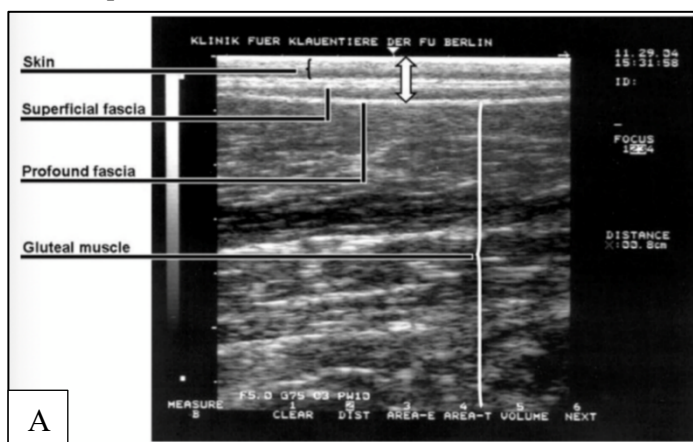


Immagine A, mostra spessore del grasso dorsale (Back Fat Thickness, BFT) in una bovina con ridotte o scarse riserve corporee (BFT = 8 mm);



Immagine B con moderata condizione corporea (BFT = 16 mm);

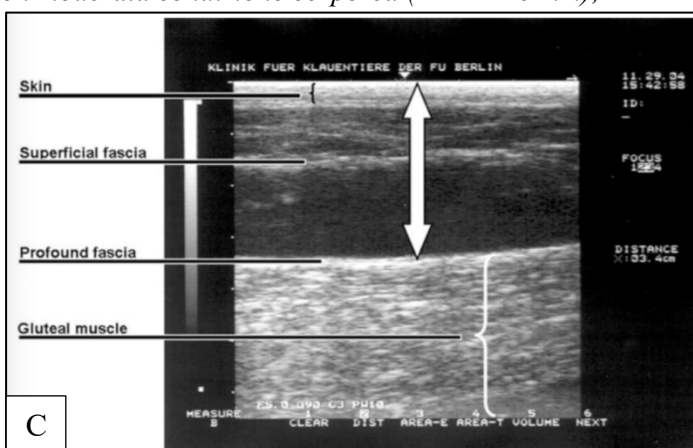


Immagine C mostra con elevata condizione corporea (BFT = 34 mm;).

Immagine tratta da Schröder and Staufienbiel, 2006

È stato dimostrato che l'utilizzo di più siti di misurazione o la valutazione bilaterale non comporta un miglioramento significativo dell'accuratezza, rendendo sufficiente l'analisi di un'unica sede con un solo lato dell'animale (Domecq et al., 1995).

Il BFT rappresenta inoltre un parametro quantitativo di rilevante interesse, in quanto strettamente correlato alla qualità della carcassa nei bovini da carne e utilizzato per la previsione della resa commerciale (Fabbri et al., 2021).

Il BFT rappresenta un parametro utile, facilmente applicabile e maggiormente oggettivo in ambito aziendale per la valutazione indiretta del rischio di sviluppare patologie metaboliche nel periodo post-partum (Schmidtman et al., 2024).

È stato infatti osservato che valori più elevati di BFT all'inizio della lattazione sono associati ad un aumento del rischio di iperchetonemia, in modo analogo a quanto descritto per il BCS. Tuttavia, a differenza del BCS, le cui variazioni settimanali risultano difficilmente rilevabili, soprattutto quando di entità ridotta, il BFT consente di identificare anche minime modificazioni grazie a misurazioni oggettive. In particolare, una riduzione di 1 mm di BFT tra la prima e la seconda settimana post-partum aumenta il rischio di iperchetonemia di 2,5 volte (Fiore et al., 2025).

Gli animali affetti da iperchetonemia mostrano una perdita di BFT più prolungata rispetto ai soggetti sani, confermando ulteriormente il valore di questo parametro come indicatore dinamico dello stato metabolico nel periodo di transizione (Schmidtman et al., 2024).

6. Ecografia muscolare

Nei bovini, le misurazioni ecografiche dello spessore del tessuto adiposo e muscolare sono impiegate da diversi anni nei programmi di selezione genetica per il miglioramento della qualità della carcassa (Fiore et al., 2020).

L'area del muscolo *longissimus dorsi* corrisponde alla sezione trasversale del muscolo rilevata a livello compreso tra la dodicesima e tredicesima costa. Questo parametro rappresenta uno degli indicatori più utilizzati per stimare la quantità totale di tessuto muscolare della carcassa ed è impiegato nella determinazione della resa (yield grade) (Williams, 2002).

Nel bovino da carne, il muscolo *longissimus dorsi* riveste un ruolo centrale nella valutazione qualitativa della carcassa, in quanto rappresenta il principale sito di riferimento per la determinazione del marbling, ossia della quantità e della distribuzione

delle inclusioni lipidiche intramuscolari, parametro strettamente correlato alle caratteristiche organolettiche della carne (Cheng et al., 2015).

Il grado di marezzatura (*marbling*) presenta un'elevata variabilità ed è influenzato da numerosi fattori, tra cui sesso, razza, dieta e peso alla macellazione (Lee et al., 2022).

La determinazione del *marbling* score può essere effettuata mediante diverse metodologie, che spaziano dalla valutazione visiva e dall'analisi chimica, fino a tecniche strumentali più avanzate. Tuttavia, molte di queste metodiche presentano limitazioni legate alla soggettività, ai tempi di esecuzione o alla scarsa applicabilità in condizioni operative (Emerson et al., 2013).

In questo contesto, l'ecografia si sta progressivamente affermando come una tecnica particolarmente promettente, grazie alla sua natura non invasiva, alla rapidità di esecuzione e alla possibilità di applicazione direttamente sull'animale vivo (Cheng et al., 2015).

L'impiego dell'ecografia, soprattutto in combinazione con approcci di analisi quantitativa delle immagini, consente infatti una stima sempre più accurata del contenuto lipidico intramuscolare, rendendola uno strumento di crescente interesse per la valutazione del *marbling* nel settore zootecnico (Lee et al., 2022).

La valutazione ecografica dell'area del muscolo *longissimus* si basa su una misurazione bidimensionale, che considera lunghezza e profondità. Di conseguenza, rispetto alla stima del BFT risulta più complesso ottenere una valutazione accurata di questo parametro (Smith et al., 1992).

L'indagine ecografica rappresenta una metodica rapida, non invasiva e di semplice esecuzione. Per la sua realizzazione è necessario un ecografo portatile in modalità B dotato di una sonda lineare, con frequenza compresa tra 5,0 e 7,5 MHz (Streeter and Step, 2007).

La scansione ecografica di LDT viene effettuata a livello dello spazio compreso tra la dodicesima e la tredicesima costa, che rappresenta il sito di riferimento internazionale per la valutazione del muscolo (Perkins et al., 1992). Questo punto corrisponde alla sede classica di sezionamento della carcassa (*ribeye area*) e consente una buona correlazione tra misurazioni ecografiche in vivo e in rilievi post-mortem (Greiner et al., 2003).

Per la misurazione della profondità del muscolo, la sonda viene posizionata perpendicolarmente alla colonna vertebrale nello spazio tra la dodicesima e la tredicesima costa. In questo modo si ottiene una sezione trasversale di LDT (Figura 9), della quale è

possibile misurare lo spessore massimo del muscolo come distanza tra le fasce muscolari (Ryder et al., 2023). Per la valutazione della lunghezza del muscolo, la sonda viene orientata parallelamente alla colonna vertebrale, sempre nello stesso spazio intercostale. Questa scansione longitudinale consente di visualizzare il muscolo lungo il suo asse maggiore, permettendo una valutazione più completa della sua morfologia (Siachos et al., 2021).

Figura 9: Immagine ecografica del muscolo longissimus dorsi utilizzata per la misurazione dello spessore del muscolo (Longissimus Dorsi Thickness, LDT) nella bovina da latte. La freccia indica la distanza tra la superficie del muscolo e il piano di riferimento sottostante, corrispondente allo spessore del muscolo longissimus dorsi. La valutazione ecografica del LDT rappresenta un metodo non invasivo per stimare le riserve proteiche corporee e lo stato nutrizionale dell'animale, fornendo informazioni complementari rispetto alla misurazione del Back Fat Thickness (BFT).

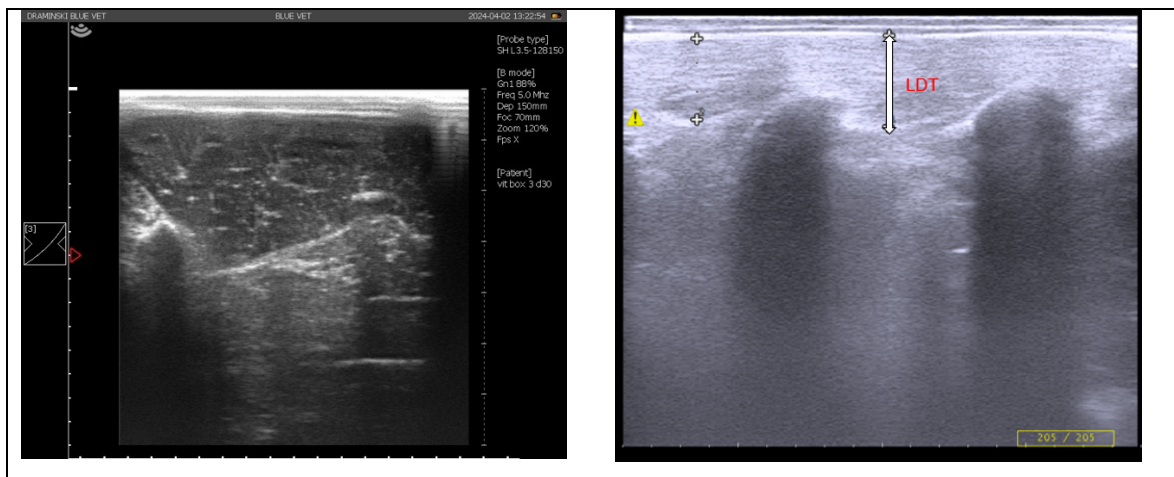


Immagine scannerizzata nel corso di attività clinica e ricerca da parte dell'U.O. Ruminanti, dell'Ospedale Veterinario Didattico Universitario del dipartimento MAPS- Università di Padova.

La misurazione ecografica di LDT si configura come uno strumento particolarmente utile per il monitoraggio della mobilizzazione proteica, offrendo informazioni complementari rispetto a quelle ottenibili attraverso il solo BCS (Williams, 2002). Tale misurazione consente di ottenere una misurazione oggettiva, ripetibile e quantitativa dello spessore muscolare, permettendo di identificare in maniera più accurata le variazioni della massa proteica durante il periodo di transizione.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il presente studio è stato condotto nell'ambito del progetto PRIN 2022 PNRR "Omics-MethaneKetoticCow" (Omics-MKC Project), finanziato dal Ministero dell'Università e della Ricerca nell'ambito del Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza, della durata di 24 mesi, che vede come unità di ricerca coinvolte l'Università degli Studi di Padova e l'Università degli Studi di Messina. Il progetto si inserisce nel contesto delle tematiche emergenti legate alla sostenibilità e alla riduzione delle emissioni di gas serra (GHG), con particolare riferimento al ruolo del settore zootecnico.

All'interno di questo ampio quadro progettuale, sono stati raccolti dati relativi a diversi aspetti metabolici, produttivi ed ambientali delle bovine da latte. Tuttavia, ai fini della presente tesi, sono stati selezionati specifici parametri selezionati, ritenuti maggiormente pertinenti rispetto agli obiettivi del lavoro.

L'attenzione è stata rivolta esclusivamente alle rilevazioni ecografiche, considerate come strumento diagnostico e di monitoraggio dello stato metabolico delle bovine da latte nel periodo di transizione.

La chetosi rappresenta una delle principali patologie metaboliche che colpiscono le bovine da latte nel periodo di transizione, con possibili ripercussioni sul metabolismo energetico e sulla funzionalità epatica. In questo contesto, l'ecografia rappresenta una tecnica diagnostica non invasiva utile per la valutazione di diverse strutture corporee e per il monitoraggio delle condizioni metaboliche degli animali.

L'obiettivo del presente studio è valutare, mediante indagine ecografica, le caratteristiche del fegato, dello spessore del grasso dorsale e della muscolatura del *longissimus dorsi* in bovine da latte affette da chetosi.

In particolare, lo studio si propone di:

1. Valutare ecograficamente le caratteristiche del fegato, analizzando il diametro della vena porta (PVD), l'area della vena porta (PVA), la DPV e la LD;
2. Misurare BFT come indicatore delle riserve energetiche corporee;
3. Valutare LDT;

contribuendo alla comprensione delle possibili modificazioni ecografiche associate alla presenza di chetosi nelle bovine da latte.

MATERIALI E METODI

1. Dichiarazione etica

La gestione degli animali e le procedure sperimentali sono state condotte in conformità con la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e con la Direttiva 2010/63/UE relativa alla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (normativa nazionale: D.L. 26/2014). Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico per la Sperimentazione Animale dell'Università di Padova (protocollo n. 103549/2024).

2. Animali e disegno sperimentale

Le bovine da latte incluse nello studio sono state arruolate da un unico allevamento di razza Frisona ad alta produzione situato nella provincia di Piacenza (Italia), nel periodo compreso tra giugno e novembre 2024. Tutti gli animali erano allevati in una stalla a cuccette libere e avevano libero accesso all'acqua e all'alimento (*ad libitum*). L'alimentazione delle bovine era basata sulla somministrazione di una razione unifeed (Total Mixed Ration, TMR), distribuita mediante il sistema Roughage Intake Control (RIC) (Hokofarm Group, Paesi Bassi). Questo sistema ha consentito la misurazione individuale dell'ingestione giornaliera di sostanza secca (Dry Matter Intake, DMI; kg/giorno) per ciascun animale, permettendo un monitoraggio accurato del consumo alimentare.

Tutte le bovine sono state sottoposte a un protocollo standard di gestione del periodo di asciutta, della durata di 60 giorni. Dopo il parto, la mungitura è stata effettuata due volte al giorno, secondo le normali pratiche di gestione aziendale. Per ciascun animale sono stati registrati diversi parametri individuali, tra cui il numero di parto, l'età, la produzione giornaliera di latte (Milk Yield, MY; kg/giorno),

Le razioni alimentari sono state formulate in base ai fabbisogni nutrizionali delle bovine da latte, tenendo conto dello stadio produttivo degli animali (Tabella 2 e Tabella 3)

***Tabella 2:** Formulazione nutrizionale della dieta somministrata alle bovine in lattazione arruolate nello studio. Gli ingredienti e la composizione sono riportati tal quali e sulla sostanza secca (SS). La composizione chimica comprende sostanza secca (SS), energia netta per la lattazione (UFL; sistema francese delle unità foraggiere), proteina grezza, grassi, fibra neutro detersa (NDF), fibra grezza, rapporto foraggio/concentrati (F/C), proteina indegradabile nel rumine (RUP), proteina solubile, carboidrati non fibrosi (NFC), amido, amido più zuccheri, proteina digeribile nell'intestino limitata dall'energia (PDIE) o dall'azoto (PDIN), calcio (Ca) e fosforo (P).*

Ingredienti della razione	Tal quale (kg)	SS (kg)	Tal quale (%)
Acqua	7,00	0,00	14,77
Farina di girasole decorticata	1,00	0,93	2,11
Farina di soia	2,70	2,43	5,70
Mais macinato	4,20	3,70	8,86
Orzo in granella	1,80	1,58	3,80
Premiscela vitaminico-minerale*	0,50	0,45	1,05
Grasso vegetale idrogenato	0,20	0,20	0,42
Melasso di barbabietola da zucchero	1,00	0,70	2,11
Crusca di frumento	3,50	3,08	7,38
Fieno di erba medica	4,50	4,08	9,49
Silomais	20,00	6,80	42,19
Paglia di frumento	1,00	0,90	2,11
Totale	47,40	24,84	100,00

Composizione sulla sostanza secca (SS): Ca 11,8%, Na 10,8%, P 6,5%, Mg 4,5%; oligoelementi: solfato rameico pentaidrato 1100 mg, ossido manganoso 1300 mg, solfato di zinco monoidrato 9400 mg, ioduro di potassio 65 mg, selenito di sodio 30 mg, DL-metionina 18000 mg, cloruro di colina microincapsulato 20000 mg; vitamine: vitamina A 900000 UI/kg, vitamina D3 150000 UI/kg, vitamina E 3000 mg/kg.

Tabella 3: Formulazione della razione alimentare somministrata alle bovine in lattazione incluse nello studio. Per ciascun ingrediente sono riportati i quantitativi espressi tal quali, corrispondente apporto in sostanza secca (SS) e la percentuale di inclusione nella razione totale.

Parametri	% SS	% tal quale
Sostanza secca	52.42	52.42
UFL	0.94	0.49
Proteina Grezza	16.07	8.42
Grassi	3.81	2.00
NDF	33.66	17.64
Fibra grezza	14.56	7.63
F/C	39.90	20.91
RUP	4.96	2.60
Proteina solubile	4.97	2.51
NFC	39.19	20.54
Amido	25.93	13.59
Amido + Zuccheri	30.41	15.94
PDIE	9.87	5.17
PDIN	10.71	5.61
Ca	0.93	0.49
P	0.53	0.28
	SS	Tal quale
UFL (Unità/kg)	0.94	0.49
NE (Mcal/kg)	1.56	0.82

Per l'inclusione nello studio sono stati applicati specifici criteri di selezione. In particolare, sono state arruolate esclusivamente bovine che soddisfacevano i seguenti requisiti:

- essere bovine da latte pluripare;
- non presentare altre patologie concomitanti, quali acidosi ruminale, dislocazione dell'abomaso, ritenzione di placenta, metrite o mastite;
- non essere sottoposte a trattamenti antimicrobici al momento dell'arruolamento nello studio.

Complessivamente sono state incluse nello studio 60 bovine di razza frisona (N = 60). Lo studio è stato condotto secondo un disegno sperimentale longitudinale, che ha previsto

la valutazione degli animali in quattro differenti momenti sperimentali durante le prime fasi della lattazione. In particolare, tutte le bovine sono state sottoposte a esame clinico, prelievo di sangue ed ecografia ai seguenti tempi di campionamento: 7, 14, 21 e 28 ± 2 giorni di lattazione (Days in Milk, DIM).

3. Prelievo di sangue e suddivisione dei gruppi sperimentali

I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena giugulare mediante provette sottovuoto e raccolti in provette Venosafe (9 ml; Terumo Venosafe, Leuven, Belgio) contenenti un attivatore della coagulazione. Una prima misurazione del β -idrossibutirrato (BHB) è stata effettuata direttamente in campo al fine di garantire la numerosità minima del campione, utilizzando un misuratore digitale portatile (Abbott Precision Xtra™ meter, Oxon, Regno Unito) e le relative strisce reattive per la determinazione dei corpi chetonici nel sangue (Abbott Precision Xtra™ Blood Ketone test strips, Oxon, Regno Unito) come mostrato in figura 10.

Figura 10: Apparecchiatura portatile utilizzata per la determinazione della concentrazione ematica di β -idrossibutirrato (BHB) in campo. La figura mostra il misuratore portatile e le relative strisce reattive impiegate per l'analisi di una goccia di sangue intero. La misurazione del BHB rappresenta un metodo rapido, pratico e affidabile per la diagnosi della chetosi subclinica e clinica nelle bovine da latte, consentendo un monitoraggio tempestivo dello stato metabolico direttamente in allevamento.



Successivamente, i campioni sono stati refrigerati a 4 °C e trasportati, mantenendo la stessa temperatura costante, al laboratorio del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) dell'Università di Padova, entro 3 ore dal prelievo,

utilizzando un congelatore portatile (CoolFreeze CFX65 W Professional, Dometic, Stoccolma, Svezia; temperatura minima $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Una volta giunti in laboratorio, le provette sono state centrifugate (Heraeus Labofuge 400, Thermo Scientific, Milano, Italia) a 3000 rpm (1,750 g) per 10 minuti a temperatura ambiente (circa $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). I sieri ottenuti per ciascuna bovina sono stati suddivisi in due aliquote uguali in provette Eppendorf da 1,5 ml e conservati a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino all'analisi biochimica.

Le analisi biochimiche sono state effettuate mediante un analizzatore automatico di chimica clinica (BT3500 Biotechnica Instruments, Roma, Italia). Per la determinazione della concentrazione sierica di BHB è stato usato il test RANBUT RX Monza (Randox, Crumlin, Regno Unito), mentre per la determinazione dei NEFA è stato adoperato il test NEFA RX Monza (Randox, Crumlin, Regno Unito).

Infine, in base alla concentrazione di BHB, le bovine sono state suddivise in due gruppi:

- gruppo sano o di controllo (CTR): BHB $< 1,0\text{ mmol/L}$ ai tempi di campionamento 7, 14, 21 e 28 DIM ($n = 43$);
- gruppo affetto da chetosi subclinica (KET): BHB $\geq 1,0\text{ mmol/L}$ in almeno uno dei tempi di campionamento ($n = 17$).

4. Esame ecografico

La valutazione ecografica del fegato, del tessuto adiposo sottocutaneo (back-fat) e del muscolo longissimus dorsi è stata effettuata su tutti gli animali ed in tutte le tempistiche mediante l'utilizzo di uno scanner ecografico portatile MylabTM OneVET (ESAOTE S.p.A., Genova, Italia – Figura 11) equipaggiato con una sonda lineare multifrequenza (Animal Science Probe, SC3421 2,5–6,6 MHz; ESAOTE S.p.A., Genova, Italia).

Figura 11: Apparecchio ecografico portatile MyLab™ OneVET (ESAOTE S.p.A., Genova, Italia) utilizzato per l'esecuzione degli esami ecografici in campo.



Per ciascuna scansione epatica sono state mantenute costanti le seguenti impostazioni: frequenza 2,5 MHz, profondità 26 cm, guadagno massimo e tempo-guadagno in posizione neutrale (Banzato et al., 2016). Le scansioni sono state effettuate a livello del 10° spazio intercostale.

L'area di esame, localizzata sul lato destro a livello degli spazi intercostali (SI) (Figura 12), è stata accuratamente deterisa e bagnata con alcool etilico al 90%, al fine di migliorare il contatto tra la sonda e la superficie cutanea. La sonda è stata quindi spostata lungo la direzione dorso-ventrale per un'escursione di circa 15 cm nello spazio intercostale.

Figura 12: Posizionamento della sonda ecografica per la valutazione del fegato nella bovina. L'esame viene eseguito con l'animale in stazione quadrupedale, posizionando la sonda sul lato destro del torace-addome muovendosi dal dodicesimo SI fino al quinto/settimo SI in direzione caudo-craniale, dorso-ventrale. Miglior finestra acustica a livello del decimo, undicesimo SI.



Immagine effettuata durante un'esercitazione pratica del corso di Animali da reddito II presso la stalla didattica dell'Università degli Studi di Padova.

Il fegato è stato inizialmente esaminato per la presenza di lesioni focali, inclusi ascessi, masse neoplastiche o infiltrazioni lipidiche anomale. Le immagini ecografiche multiple sono state archiviate in formato JPEG, al fine di permettere successive analisi quantitative. Per ciascun animale e per ogni tempo di valutazione, sono state eseguite le misurazioni dei principali parametri epatici (Figura 13):

- Profondità epatica (LD, Liver Depth - mm)
- Profondità della vena porta (DPV, Depth of Portal Vein, mm)
- Diametro della vena porta (PVD, Portal Vein Diameter - mm)
- Area della vena porta (PVA, Portal Vein Area - cm²)

Tutte le misurazioni sono state effettuate utilizzando il software MyLab Desk (ESAOTE S.p.A., Genova, Italia) (Fiore et al., 2018).

Figura 13: Rappresentazione ecografica del fegato bovino e dei principali parametri morfometrici valutabili mediante US. Le immagini mostrano differenti scansioni ecografiche del parenchima epatico e delle strutture vascolari associate, con particolare riferimento alla vena porta (PV) e alla vena epatica (VH). Sono indicate la profondità epatica che in queste scansioni viene definita come DL, la profondità dei tessuti superficiali e profondi rispetto al parenchima epatico (DPAT e TPAT), DPV e PVD, nonché il diametro e la profondità della vena epatica (HVD e DHV). Tali misurazioni consentono una valutazione ecografica della morfologia epatica e della componente vascolare.

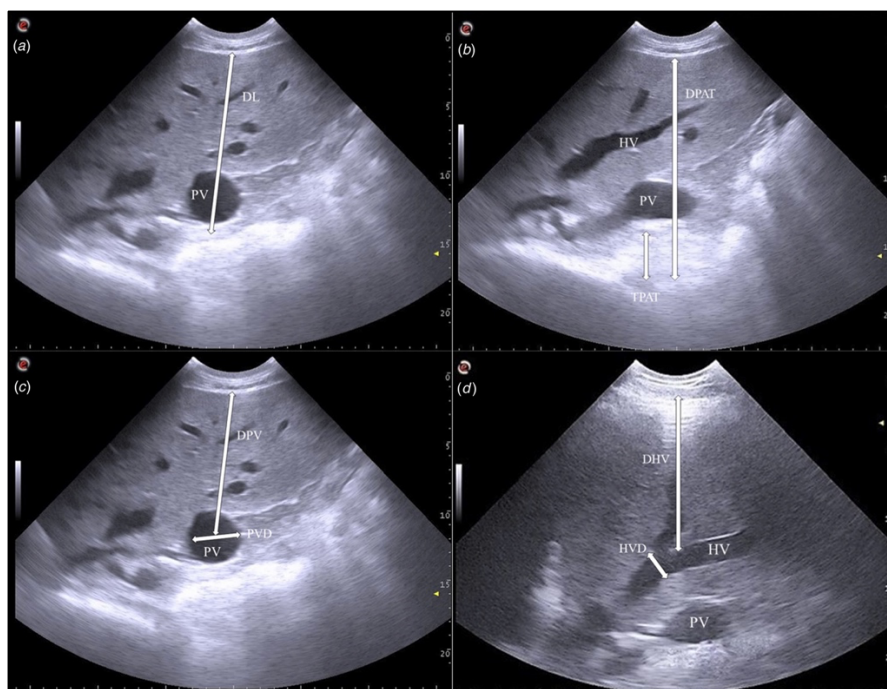


Immagine tratta da Fiore et al., 2018

Il BFT è stato valutato mediante ecografia utilizzando una sonda lineare con frequenza di 5 MHz (ESAOTE S.p.A., Genova, Italia), collegata allo scanner portatile MyLab OneVET.

La sonda è stata posizionata verticalmente rispetto a una linea immaginaria tracciata tra le tuberosità ischiatiche (*tuber ischii*) e le tuberosità coxali (*tuber coxae*), nel sito di esame sacrale, situato a circa 9–11 cm cranialmente rispetto alle tuberosità ischiatiche.

Le immagini ecografiche sono state acquisite e analizzate utilizzando il software MyLab Desk (ESAOTE S.p.A., Genova, Italia), che ha permesso la misurazione precisa dello spessore del grasso sottocutaneo tra la cute e la fascia *trunci profunda*, posizionata sopra il muscolo *gluteus medius*.

Per ogni animale e per ciascun tempo di valutazione, sono state registrate le misurazioni dello BFT in millimetri, garantendo una valutazione standardizzata e ripetibile tra gli animali.

Il LDT è stato valutato mediante esame ecografico utilizzando una sonda lineare con frequenza di 5 MHz (ESAOTE S.p.A., Genova, Italia), collegata allo scanner portatile MyLab OneVET.

La sonda è stata posizionata in senso trasversale rispetto all'asse longitudinale del corpo, a livello della 12° spazio intercostale, nella regione dorsolombare. Questo sito di rilevazione è stato selezionato al fine di garantire la ripetibilità delle misurazioni e l'analisi di una porzione rappresentativa del muscolo *longissimus dorsi*.

Le immagini ecografiche sono state acquisite e successivamente analizzate tramite il software MyLab Desk (ESAOTE S.p.A., Genova, Italia), permettendo la misurazione dello spessore muscolare in millimetri per ciascun animale e per ogni tempo di valutazione.

5. Analisi statistica

La dimensione minima del campione è stata calcolata a priori utilizzando il software G*Power (versione 3.1.9.7) (<http://www.gpower.hhu.de/>). La potenza campionaria dello studio è stata impostata a 0,95 ($\beta = 0,05$) e il livello di significatività a $\alpha = 0,05$. L'analisi è stata effettuata utilizzando la concentrazione di BHB nelle bovine sane e in quelle affette da chetosi subclinica (KET) come variabile discriminante. La dimensione dell'effetto è stata stimata pari a 1,317, e la dimensione minima totale del campione risultante è stata di 10 animali.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software R (pacchetto "Rcmdr", versione 4.5.1). La distribuzione normale e l'omogeneità della varianza sono state verificate rispettivamente mediante i test di Shapiro-Wilk e Levene. Per la selezione dei modelli è stato utilizzato sia il criterio di informazione di Akaike (AIC) sia il criterio di informazione bayesiano (BIC), scegliendo il modello con i valori più bassi di AIC e BIC, indicativi della migliore performance.

I dati sono stati analizzati mediante un modello misto (mixed model) che includeva le seguenti variabili fisse:

- Gruppo (KET vs. CTR)
- Tempo (+7, +14, +21, +28 giorni di lattazione, DIM)
- Stato di salute (sano o affetto da SCK al singolo tempo di campionamento)
- Interazioni tra le variabili sopra riportate

L'animale è stato incluso come fattore casuale (random effect). Le variabili risposta sono state: BHB, NEFA, DPV, PVD, PVA, LD, BFT, LDT. In generale, è stato accettato un limite di significatività di $P \leq 0,05$.

RISULTATI

Il primo passo dell'analisi dei dati è stato calcolare i valori di prevalenza e incidenza dei casi di chetosi subclinica durante tutta la durata dell'esperimento. I risultati sono riportati in Figura 14 e Tabella 4. In particolare, la Figura 14 mostra la variazione della prevalenza e dell'incidenza della chetosi subclinica nei diversi tempi di campionamento, mentre la Tabella 1 riporta le stime delle medie dei quadrati minimi (*least square means*) e i risultati dell'analisi mediante modello misto lineare per i parametri metabolici NEFA e BHB.

Figura 14: Prevalenza e incidenza (%) di chetosi subclinica nelle bovine da latte durante i quattro tempi di campionamento (7, 14, 21 e 28 DIM).

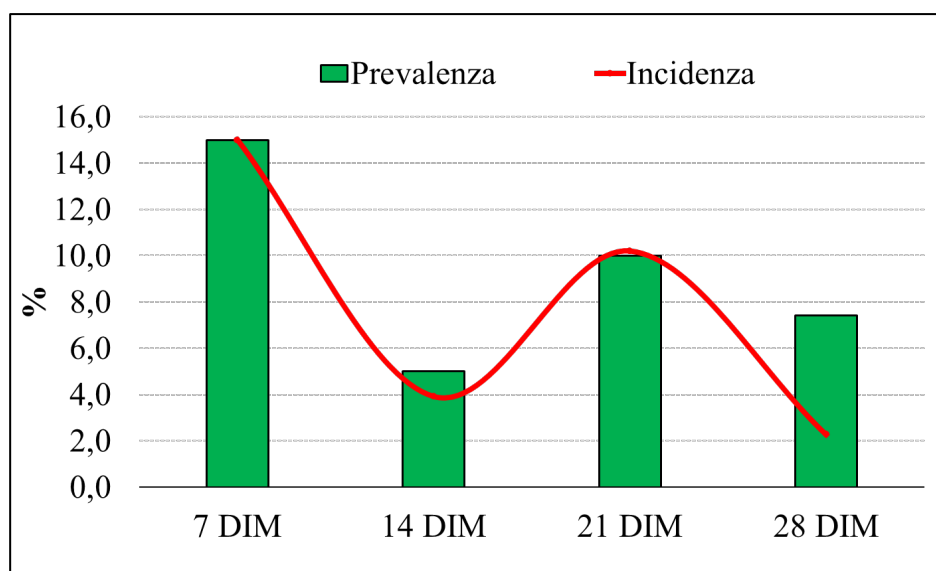


Tabella 4: sono riportati i risultati del modello misto lineare (*p-values*) e le medie dei quadrati minimi (*least square means*) per gli acidi grassi non esterificati (NEFA) e per il β -idrossibutirrato (BHB). I valori sono espressi come media $\pm$ SEM (errore standard della media).

Parametro	Gruppo	7 DIM	14 DIM	21 DIM	28 DIM	SEM ¹	Gruppo	Tempo	Interazione (Gruppo $\times$ Tempo)
NEFA (mEq/L)	CTR	0.46 ^{y, b}	0.43 ^{y, b}	0.42 ^b	0.65 ^a	0.06	0.013	0.006	0.201
	KET	0.71 ^{x, a}	0.59 ^{x, ab}	0.44 ^b	0.63 ^a	0.08			
BHB (mmol/L)	CTR	0.56 ^y	0.51	0.53 ^y	0.59	0.07	<0.001	0.538	0.209
	KET	0.91 ^{x, a}	0.66 ^b	0.77 ^{x, b}	0.79 ^{ab}	0.11			

¹Errore standard delle medie;

^{x-y} Indicano differenze significative tra gruppi nella stessa tempistica;

^{a-b} Indicano differenze significative entro lo stesso gruppo nelle differenti tempistiche.

I valori di incidenza e prevalenza di SCK insieme ai risultati del modello misto lineare per NEFA e BHB ai giorni 7, 14, 21 e 28 DIM, sono riportati in Tabella 4. La maggior parte dei nuovi casi si è verificata nei giorni 7 e 21 DIM.

Per quanto riguarda i NEFA è stato osservato un effetto significativo sia del gruppo ($p < 0,013$) sia del tempo ($p < 0,006$). Le bovine del gruppo KET hanno mostrato concentrazioni di NEFA più elevate rispetto al gruppo di controllo (CTR) ai giorni 7 e 14 DIM. I livelli di NEFA sono aumentati in entrambi i gruppi al giorno 28 DIM, indicando un incremento temporale durante la prima fase della lattazione.

Per quanto riguarda il BHB, è stato rilevato un effetto significativo del gruppo ($p < 0,001$), con concentrazioni più elevate nelle bovine del gruppo KET ai giorni 7 e 21 DIM.

I risultati dell'ANOVA modello misto riguardanti i parametri ecografici di fegato, BFT e LDT sono riportati nella Tabella 5.

Tabella 5: Valori dei parametri ecografici epatici e delle riserve corporee in bovine da latte sane (CTR) e affette da chetosi (KET) a 7, 14, 21, 28 DIM, con errore standard della media (SEM) e significatività degli effetti di gruppo, tempo e dell'interazione gruppo x tempo. Risultati del modello misto lineare.

Parametri	Gruppo	7 DIM	14 DIM	21 DIM	28 DIM	SEM ¹	Gruppo	Tempo	Interazione (Gruppo x Tempo)
LD (mm)	CTR	153	149 ^y	150 ^y	148 ^y	2.33	0.022	0.522	0.038
	KET	153 ^b	156 ^{x,a}	160 ^{x,ab}	161 ^{x,a}	3.12			
DPV (mm)	CTR	122 ^a	113 ^b	113 ^b	118 ^{ab}	3.10	0.994	0.058	0.641
	KET	122	122	119	123	4.84			
PVD (mm)	CTR	39.00 ^x	39.00 ^x	39.00 ^x	38.20	0.87	0.023	0.676	0.638
	KET	35.40 ^y	35.50 ^y	35.50 ^b	36.70	1.37			
PVA (cm ²)	CTR	10.72 ^x	10.59 ^x	10.72 ^x	10.81	0.52	0.026	0.251	<0.001
	KET	9.06 ^y	8.95 ^y	9.50 ^y	9.69	0.56			
BFT (mm)	CTR	6.59 ^y	6.11	6.22 ^y	6.60	0.32	0.009	0.251	<0.001
	KET	8.09 ^{x,a}	6.04 ^b	5.62 ^b	5.73 ^b	0.50			
LDT (mm)	CTR	29.50	29.30	32.00	32.10	1.56	0.269	0.940	0.215
	KET	28.40	30.40	28.10	31.70	2.44			

¹Errore standard delle medie;

^{x-y} Indicano differenze significative tra gruppi nella stessa tempistica;

^{a-b} Indicano differenze significative entro lo stesso gruppo nelle differenti tempistiche.

Per quanto riguarda la LD è stato osservato un effetto significativo del gruppo ($p < 0,022$) e dell'interazione gruppo $\times$ tempo ($p < 0,038$), mentre il tempo non ha mostrato un effetto significativo ($p < 0,522$). Nel gruppo KET si è osservato un progressivo aumento della LD nel corso della lattazione precoce, con valori più elevati ai giorni 21 e 28 DIM rispetto al gruppo CTR.

Per la DPV non sono emerse differenze significative tra i gruppi ($p < 0,994$), mentre è stato osservato un effetto tendenziale del tempo ($p < 0,058$). Nel gruppo CTR si è osservata una riduzione della DPV ai giorni 14 e 21 DIM rispetto al giorno 7 DIM, mentre nel gruppo KET i valori sono rimasti relativamente stabili nel corso del periodo considerato.

Per quanto riguarda il PVD, è stato osservato un effetto significativo del gruppo ($p < 0,023$), mentre non sono stati evidenziati effetti significativi del tempo ($p < 0,676$) né dell'interazione gruppo $\times$ tempo ($p < 0,638$). In generale, le bovine appartenenti al gruppo CTR hanno mostrato valori medi di PVD superiori rispetto alle bovine del gruppo KET nei primi tre tempi di campionamento (7, 14 e 21 DIM).

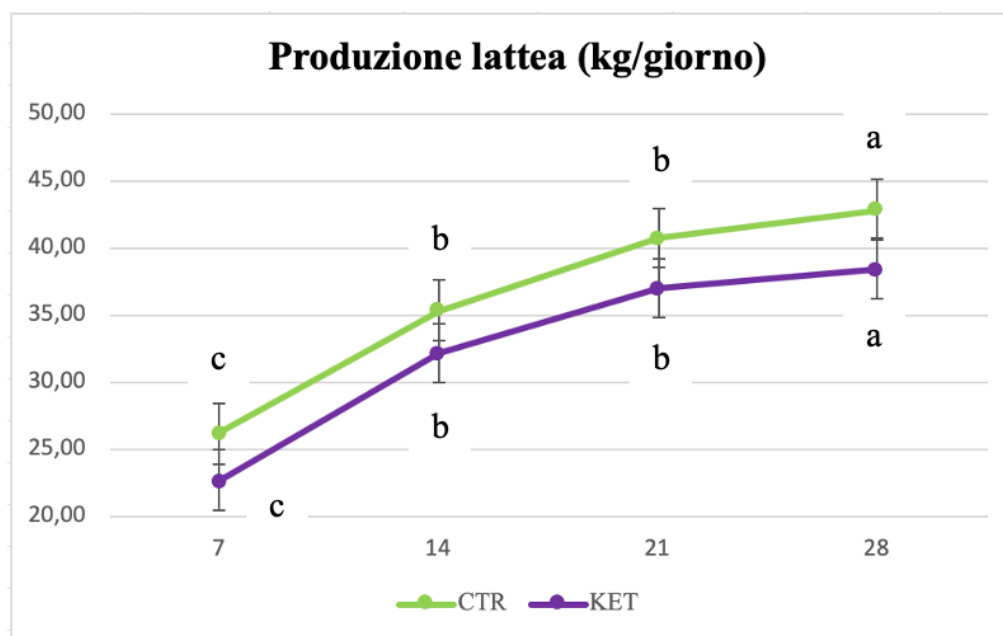
La PVA ha mostrato un effetto significativo del gruppo ($p < 0,026$) e una interazione significativa gruppo $\times$ tempo ($p < 0,001$), mentre l'effetto del tempo non è risultato significativo ($p < 0,251$). In particolare, le bovine del gruppo CTR hanno presentato valori di PVA più elevati rispetto al gruppo KET nei primi tre tempi di valutazione (7, 14 e 21 DIM).

Relativamente al BFT è stato osservato un effetto significativo del gruppo ($p < 0,009$) e dell'interazione gruppo $\times$ tempo ($p < 0,001$), mentre l'effetto del tempo non è risultato significativo ($p < 0,251$). In particolare, le bovine del gruppo KET hanno mostrato un BFT significativamente maggiore al giorno 7 DIM rispetto al gruppo CTR, seguito da una riduzione progressiva nei tempi successivi.

Infine, per quanto riguarda LDT, non sono state osservate differenze significative né tra i gruppi ($p < 0,269$), né tra i tempi di campionamento ($p < 0,940$), né per l'interazione gruppo $\times$ tempo ($p < 0,215$).

Per quanto concerne la produzione lattea, non è stato osservato un effetto significativo del gruppo, sebbene le bovine appartenenti al gruppo KET abbiano mostrato valori numericamente inferiori rispetto al gruppo CTR in tutti i tempi di campionamento (Figura 15). In particolare, la produzione media del latte a 7, 14, 21, 28 DIM è risultata pari a 26,20 Kg/giorno, 35,40 Kg/giorno, 40,80 kg/giorno, 42,90 kg/giorno nel gruppo CTR mentre è risulta pari a 22,70 kg/giorno, 32,20 kg/giorno, 37,10 kg/giorno e 38,50 kg/giorno nel gruppo KET. L'effetto del gruppo ha mostrato solo una tendenza statistica ($p < 0,072$), mentre non è stata rilevata un'interazione significativa tra gruppo e tempo ($p < 0,290$). Al contrario, è emerso un effetto significativo del tempo ($P < 0,001$), indicativo di un progressivo aumento della produzione lattea nel corso delle prime settimane post-partum.

Figura 15: Andamento della produzione lattea media nei gruppi CTR e KET durante le prime quattro settimane di lattazione. Il grafico mostra la produzione di latte espressa in kg/giorno a 7, 14, 21, 28 giorni di lattazione (DIM). In entrambi i gruppi si osserva un progressivo aumento della produzione lattea nel tempo, coerente con il normale andamento fisiologico della lattazione precoce.



^{a-c} Indicano differenze significative tra gruppi nella stessa tempistica;

DISCUSSIONE

In letteratura è ampiamente riportato come il rischio di sviluppare chetosi sia maggiore nelle prime settimane di lattazione, a causa del NEB e dell'intensa mobilitazione delle riserve corporee. In linea con quanto precedentemente discusso, i risultati del presente studio confermano tale andamento evidenziando come la SCK si manifesti prevalentemente nella fase iniziale della lattazione, periodo caratterizzato da importanti sfide metaboliche per le bovine (Goff et al., 1995).

In particolare, la prevalenza ha raggiunto un valore massimo pari al 15% al giorno 7 DIM, per poi ridursi al 5% e al 7,4% rispettivamente ai giorni 14 e 28 DIM. Analogamente, l'incidenza è risultata più elevata nella prima settimana post-partum (15%), diminuendo progressivamente nei tempi successivi e confermando il carattere transitorio dello squilibrio metabolico (Zhang and Ametaj, 2020).

Tali risultati supportano l'ipotesi secondo cui la fase immediatamente successiva al parto rappresenti il momento di maggiore criticità dal punto di vista metabolico in quanto le bovine devono far fronte contemporaneamente all'avvio della lattazione e all'incremento delle richieste energetiche, spesso non compensate da un'adeguata ingestione di sostanza secca (Berge and Vertenten, 2014). Questo determina un'intensa mobilitazione delle riserve corporee e un conseguente aumento della produzione di corpi chetonici (Ospina et al., 2010). Il marcato incremento dei casi osservato nella prima settimana post-partum evidenzia quindi l'importanza di questo periodo come finestra critica per il monitoraggio metabolico degli animali e per l'attuazione di strategie di prevenzione e diagnosi precoce della patologia (Oetzel, 2004).

Al contrario, la diminuzione della prevalenza e dell'incidenza osservata nelle settimane successive al parto potrebbe indicare un graduale adattamento metabolico delle bovine alla lattazione verosimilmente correlato al progressivo aumento dell'ingestione di alimento e alla stabilizzazione delle richieste energetiche e produttive nel corso della fase iniziale della lattazione (Mezzetti et al., 2021).

Le concentrazioni plasmatiche di NEFA rappresentano un indicatore particolarmente utile per valutare l'intensità del NEB nelle prime fasi della lattazione, poiché riflettono direttamente il grado di mobilitazione delle riserve lipidiche corporee. Nel presente studio, le bovine appartenenti al gruppo KET hanno mostrato valori di NEFA superiori alla soglia di 0,57 mmol/L, soprattutto durante le prime due settimane dopo il parto

(Ospina et al., 2010). Questo andamento conferma come, nei soggetti affetti da chetosi subclinica, la richiesta energetica legata all'avvio della lattazione venga compensata attraverso un'intensa lipolisi del tessuto adiposo (Rousing et al., 2020).

Tale risposta metabolica, sebbene inizialmente adattativa, può diventare sfavorevole quando l'afflusso di NEFA supera la capacità epatica di ossidarli o esportarli sotto forma di lipoproteine, favorendo così l'accumulo lipidico epatico e l'alterazione della funzionalità metabolica (Fiore et al., 2018).

Al contrario, le concentrazioni medie di BHB hanno superato solo raramente il valore di 1,00 mmol/L. Questo dato deve tuttavia essere interpretato con cautela, poiché la valutazione basata sulle medie di gruppo può attenuare la reale presenza di soggetti con chetosi subclinica nei singoli tempi di campionamento. Infatti, la presenza di animali sani all'interno del gruppo valutato in ciascun tempo può ridurre il valore medio complessivo, mascherando l'effettiva incidenza della patologia. Per questo motivo, il BHB non dovrebbe essere considerato esclusivamente come valore medio, ma interpretato insieme alla prevalenza e all'incidenza dei casi di chetosi, così da ottenere una rappresentazione più accurata dello stato metabolico della mandria (Benedet et al., 2019).

Nel complesso, NEFA e BHB forniscono informazioni complementari e dovrebbero essere valutati congiuntamente nella caratterizzazione del metabolismo energetico della bovina in transizione (Sordillo and Raphael, 2013).

L'aumento dei NEFA indica una maggiore mobilitazione del tessuto adiposo in risposta al deficit energetico, mentre l'incremento del BHB riflette la quota di acidi grassi che, a livello epatico, viene indirizzata verso la chetogenesi. Pertanto, la presenza di valori elevati di NEFA, anche in assenza di un marcato aumento medio del BHB, può rappresentare un segnale precoce di squilibrio metabolico e di aumentato rischio di sviluppo di chetosi subclinica o lipidosi epatica (Contreras and Sordillo, 2011).

Per quanto riguarda la valutazione ecografica epatica, un dato particolarmente rilevante riguarda la LD, risultata maggiore nelle bovine del gruppo KET ai giorni 14, 21, 28 DIM rispetto al gruppo controllo, con un effetto significativo sul tempo. Inoltre, i valori medi osservati nel gruppo KET sono risultati superiori al cut-off di 152,60 mm riportato da (Fiore et al., 2018) per l'identificazione ecografica della lipidosi epatica in tutti i tempi di campionamento.

Questo risultato supporta l'ipotesi che le bovine affette da chetosi possano presentare un maggiore accumulo lipidico a livello epatico, compatibile con il quadro metabolico tipico

della chetosi subclinica (Elshafey et al., 2023). L'aumento della LD potrebbe quindi rappresentare un indicatore ecografico indiretto di alterazioni del parenchima epatico e rafforzare il ruolo dell'ecografia come strumento utile nel monitoraggio delle condizioni metaboliche del periodo post-partum (Banzato et al., 2016). Tale risultato conferma l'importanza del fegato nel sostenere le elevate richieste metaboliche della lattazione, in particolare attraverso la regolazione del metabolismo energetico e la disponibilità di precursori glicogenetici (Angeli et al., 2019).

La DPV ha mostrato un effetto del tempo esclusivamente nel gruppo CTR, con il valore più elevato osservato al giorno 7 post-partum e una successiva riduzione delle settimane seguenti. Nel gruppo KET, invece, i valori sono risultati più stabili, suggerendo una diversa risposta adattativa della componente epatica e vascolare.

Il PVD ha evidenziato un effetto significativo del gruppo, mostrando valori inferiori nelle bovine appartenenti al gruppo KET rispetto al gruppo CTR nei primi tempi di osservazione. In particolare, ai giorni 7, 14, 21 DIM, le bovine in chetosi hanno presentato valori medi di PVD inferiori rispetto a quelli osservati nel gruppo di controllo nei medesimi tempi.

Un andamento analogo è stato riscontrato per la PVA, risultata più elevata nel gruppo CTR rispetto al gruppo KET durante il periodo di studio. Tuttavia, è importante sottolineare che, in entrambi i gruppi, i valori di DPV sono rimasti compresi all'interno dell'intervallo fisiologico riportato da (Braun, 2009), pari a 29-53 mm.

Questo dato suggerisce che le differenze osservate tra i gruppi non siano riconducibili ad una condizione patologica evidente della vena porta, ma piuttosto a variazioni funzionali della circolazione epatica associate al diverso stato metabolico degli animali. La maggior ampiezza di PVD e PVA nelle bovine sane potrebbe riflettere una migliore efficienza della perfusione epatica durante la lattazione precoce. In questa fase, il fegato svolge un ruolo centrale nel metabolismo energetico, nella gluconeogenesi e nella gestione dei substrati derivanti dalla mobilitazione delle riserve corporee (Angeli et al., 2019).

Un maggiore flusso portale potrebbe quindi essere interpretato come una risposta fisiologica finalizzata a sostenere l'elevata attività metabolica richiesta dall'inizio della produzione latte. Al contrario, nelle bovine affette da chetosi, la riduzione del PVD e della PVA potrebbe indicare una modificazione della dinamica circolatoria epatica, potenzialmente legata ad una minore efficienza funzionale del fegato o ad un'alterazione

del metabolismo epatico conseguente al NEB o all'eccessiva mobilizzazione lipidica (Giannuzzi et al., 2021).

Tale interpretazione risulta coerente con il ruolo del fegato nel periodo di transizione, durante il quale l'elevato afflusso di NEFA può superare la capacità epatica di ossidazione o esportazione, favorendo l'accumulo lipidico e la comparsa di disfunzioni metaboliche (Drackley, 1999). In questo contesto, le variazioni dei parametri vascolari epatici osservate nel gruppo KET potrebbero rappresentare un segnale indiretto di adattamento o compromissione della funzionalità epatica. Inoltre, le differenze tra i gruppi potrebbero essere influenzate anche dalla produzione latte, poiché è noto che le bovine affette da chetosi tendono a presentare performance produttive inferiori rispetto ai soggetti sani (Rajala-Schultz et al., 1999).

La maggiore PVA osservata nel gruppo CTR potrebbe quindi essere associata ad una maggiore richiesta metabolica e circolatoria necessaria a sostenere una produzione di latte più elevata (Braun and Gerber, 1994).

Per quanto riguarda il BFT, le bovine del gruppo KET hanno mostrato valori più elevati al giorno 7 DIM rispetto al gruppo CTR, seguiti da una marcata riduzione nel corso delle valutazioni successive. Al contrario, il gruppo CTR ha mantenuto valori di BFT relativamente stabili durante l'intero periodo sperimentale; tali valori indicano una mobilizzazione lipidica meno accentuata e un migliore adattamento metabolico al post-partum (Fiore et al., 2025).

I risultati ottenuti nel presente studio evidenziano come le bovine del gruppo KET abbiano mostrato una progressiva riduzione dello BFT nel corso del periodo post-partum, confermando il ruolo centrale della mobilizzazione adiposa nella patogenesi della SCK. Le bovine che hanno sviluppato chetosi presentavano inizialmente valori di BFT più elevati rispetto agli animali sani, suggerendo una maggiore disponibilità di riserve lipidiche al momento del parto. Questo dato appare coerente con quanto riportato in letteratura, secondo cui soggetti con una condizione corporea più elevata risultano maggiormente predisposti ad un'intensa mobilizzazione lipidica nel post-partum e, conseguentemente, ad un aumentato rischio di iperchetonemia e disordini metabolici (Roche et al., 2009; Busato et al., 2002).

La marcata riduzione del BFT osservata nel gruppo KET riflette verosimilmente l'aumento della lipolisi del tessuto adiposo indotta dal NEB tipico della lattazione precoce (Gross et al., 2013).

In queste condizioni, l'organismo incrementa il rilascio di NEFA nel circolo ematico al fine di sostenere le elevate richieste energetiche della produzione latte. Gli acidi grassi mobilizzati vengono quindi captati dal fegato, dove possono essere completamente ossidati a scopo energetico, convertiti in corpi chetonici oppure ri-esterificati in trigliceridi, contribuendo allo sviluppo di chetosi e lipidosi epatica (Drackley et al., 1992; Toscano et al., 2023).

I risultati ottenuti supportano inoltre quanto descritto da (Fiore et al., 2025), secondo cui anche minime variazioni del BFT nel periodo post-partum risultano strettamente associate al rischio di sviluppare iperchetonemia. In particolare, è stato riportato che il rischio di chetosi aumenta progressivamente all'aumentare dello spessore del grasso dorsale al parto, evidenziando il valore del BFT quale parametro dinamico e oggettivo per il monitoraggio dello stato metabolico della bovina nel periodo di transizione.

Al contrario, nel presente studio non sono state osservate differenze significative nel LDT tra i gruppi, né variazioni rilevanti nel tempo. Questo risultato suggerisce che, durante la fase iniziale della lattazione, la mobilitazione del tessuto muscolare sia meno marcata rispetto a quella del tessuto adiposo, indicando una relativa preservazione delle riserve proteiche anche nelle bovine affette da chetosi (van der Drift et al., 2012). Tale osservazione risulta in accordo con quanto riportato in letteratura, dove la mobilitazione lipidica rappresenta il principale meccanismo adattativo al NEB nel post-partum precoce, mentre il catabolismo muscolare sembra assumere un ruolo più limitato e variabile (Barletta et al., 2017).

Questi risultati confermano l'utilità dell'ecografia del BFT come metodica non invasiva, rapida e applicabile in campo per l'identificazione precoce delle bovine maggiormente predisposte ad una mobilitazione lipidica eccessiva e di conseguenza, allo sviluppo di disordini metabolici durante il periodo di transizione (Fiore et al., 2025).

Nel complesso, i risultati ottenuti nel presente studio evidenziano il ruolo rilevante dell'ecografia come strumento di monitoraggio dello stato metabolico delle bovine da latte durante il periodo di transizione, in particolare per l'identificazione precoce delle alterazioni associate alla chetosi subclinica. Le bovine che hanno sviluppato chetosi presentavano infatti caratteristiche ecografiche differenti rispetto agli animali sani già nelle prime settimane di lattazione, suggerendo un diverso adattamento metabolico al NEB tipico del post-partum (Banzato et al., 2016).

In particolare, le bovine appartenenti al gruppo KET mostravano un BFT maggiore al momento del parto, indicando una maggiore disponibilità iniziale di riserve adipose. La successiva riduzione progressiva del BFT osservata nel corso delle settimane successive riflette verosimilmente un'intensa mobilitazione lipidica finalizzata a compensare le elevate richieste energetiche legato all'avvio della lattazione (Roche et al., 2009).

Questo processo determina un aumento del rilascio di NEFA nel circolo ematico e un maggiore coinvolgimento del fegato nella gestione dei substrati energetici derivanti dalla lipolisi (Contreras and Sordillo, 2011).

Parallelamente, l'aumento della LD osservato nel gruppo KET suggerisce la presenza di alterazioni del parenchima epatico compatibili con un maggiore accumulo lipidico, supportando l'ipotesi dello sviluppo di steatosi epatica nelle bovine affette da chetosi subclinica. Tali modificazioni appaiono coerenti con il quadro fisiopatologico tipico del periodo di transizione, durante il quale l'eccessivo afflusso di NEFA può superare la capacità epatica di ossidazione ed esportazione dei lipidi, favorendo l'accumulo di trigliceridi a livello epatico (Drackley, 1999).

Le bovine in chetosi hanno inoltre mostrato variazioni significative dei parametri vascolari epatici, in particolare del PVD e PVA, rispetto agli animali sani. Questi risultati suggeriscono una possibile alterazione della perfusione epatica e della funzionalità metabolica del fegato nelle bovine affette da chetosi. Considerando il ruolo centrale del fegato nella gluconeogenesi, nella chetogenesi e nella regolazione del metabolismo energetico durante la lattazione precoce; le modificazioni ecografiche osservate potrebbero rappresentare indicatori indiretti di compromissione metabolica associata al NEB (Angeli et al., 2019).

Al contrario, l'assenza di differenze significative nel LDT tra i gruppi suggerisce che, nelle prime fasi post-partum, la mobilitazione delle riserve corporee coinvolga prevalentemente il tessuto adiposo piuttosto che quello muscolare. Questo dato conferma come la lipolisi rappresenti il principale meccanismo adattativo alla carenza energetica nel periodo immediatamente successivo al parto (Contreras and Sordillo, 2011).

Per quanto riguarda la produzione latte, i risultati del presente studio hanno evidenziato un incremento significativo nel tempo in entrambi i gruppi, senza un effetto significativo tra i due gruppi. In particolare, le bovine del gruppo KET hanno mostrato valori inferiori rispetto al gruppo CTR in tutti i tempi di campionamento, pur in assenza di una differenza statisticamente significativa tra i gruppi. Questo andamento suggerisce che la condizione

di chetosi possa influenzare negativamente la performance produttiva, ma che, nelle condizioni del presente studio, tale effetto non sia stato abbastanza marcato da determinare una differenza significativa tra i gruppi. Tale risultato è coerente con quanto riportato in letteratura, secondo cui concentrazioni più elevate di BHB nelle prime due settimane dopo il parto sono associate ad una riduzione della produzione latte, ad un aumento della percentuale di grasso nel latte e ad una riduzione della quota proteica (Duffield, 2000). Inoltre, è stato riportato che bovine affette da chetosi tendono a presentare performance produttive inferiori rispetto ai soggetti sani (Rajala-Shultz et al., 1999).

Per quanto concerne le valutazioni emerse nello studio è da notare come il ruolo dell'ecografia quale strumento di monitoraggio dello stato metabolico della bovina da latte durante il periodo di transizione evidenzia differenze significative tra animali sani e affetti da chetosi subclinica. Tuttavia, potrebbero emergere potenziali limiti nello studio stesso dati da alcuni aspetti che meritano ulteriori approfondimenti. Il primo punto di criticità è legato al fatto che la popolazione su cui è stato condotto lo studio appartiene a un unico allevamento e che sarebbe stato utile investigare non solo le prime settimane di lattazione, ma avere un continuum fino al termine della produzione di latte stesso. Pertanto, l'aumento delle osservazioni potrebbe in futuro essere esteso ad un numero maggiore di aziende ed animali, appartenenti a differenti realtà produttive, management e gestione alimentare. Invece, un periodo di monitoraggio più prolungato consentirebbe di confermare e consolidare i risultati ottenuti.

In futuro, sarà inoltre interessante integrare la valutazione ecografica con ulteriori biomarcatori metabolici e con tecnologie di precision livestock farming, al fine di sviluppare strumenti diagnostici sempre più accurati per l'identificazione precoce delle bovine a rischio di malattie metabolico-nutrizionali.

Ulteriori studi potranno, inoltre, contribuire a definire valori di riferimento dei principali parametri ecografici epatici e corporei nelle diverse fasi della lattazione. Questo, potrebbe dar vita ad un nuovo approccio preventivo basato sul monitoraggio ecografico che potrebbe contribuire al miglioramento dello stato sanitario e del benessere animale, oltre a determinare benefici significativi sulle performance produttive e sulla sostenibilità economica degli allevamenti da latte.

CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati di questo studio hanno evidenziato il potenziale dell'ecografia come strumento complementare nella gestione della bovina da latte dal punto di vista metabolico nel post parto.

L'approccio ecografico consente di osservare in modo diretto e ripetibile alcune modificazioni morfologiche associate all'adattamento metabolico della fase di transizione, offrendo informazioni utili per una valutazione più completa dell'animale.

L'interesse principale di questa metodica risiede nella possibilità di trasferire il monitoraggio metabolico dalla sola dimensione laboratoristica ad una valutazione più dinamica e applicabile direttamente in allevamento. L'ecografia risulta essere di facile esecuzione, sicura per l'animale e ripetibile nel corso del tempo, oltre a poter essere applicata direttamente in campo; per queste caratteristiche, può costituire uno strumento utile per il veterinario aziendale nel riconoscimento precoce delle bovine con maggiore vulnerabilità metabolica, in particolare durante il periodo di transizione.

In ambito pratico, l'esame ecografico potrebbe essere integrato nei protocolli di controllo del periodo di transizione, affiancando la misurazione di BHB e NEFA, la valutazione del BCS, il monitoraggio della produzione latte e l'osservazione clinica dell'animale.

La valutazione ecografica di LD, dei parametri vascolari della vena porta e del BFT potrebbe contribuire ad identificare precocemente soggetti che, pur non manifestando segni clinici evidenti, presentano un adattamento metabolico meno efficiente. Questo permetterebbe di intervenire in modo più tempestivo con correzioni nutrizionali, strategie di supporto energetico e controlli più ravvicinati degli animali a rischio.

È tuttavia necessario considerare alcuni aspetti critici prima di proporre un impiego routinario della metodica. L'esame ecografico richiede standardizzazione dei punti di repere, uniformità delle misurazioni e adeguata formazione, poiché errori di posizionamento della sonda, impostazioni non corrette dell'apparecchio o differenze di esperienza possono influenzare l'interpretazione dei risultati. Inoltre, i parametri ecografici devono essere considerati ed integrati con dati clinici, produttivi e metabolici, così da evitare valutazioni non rappresentative dello stato reale dell'animale.

Le prospettive future dovrebbero orientarsi verso la definizione di protocolli ecografici semplici, riproducibili e applicabili su larga scala in allevamento. Sarà inoltre importante

validare i principali parametri ecografici su popolazioni più ampie, in aziende diverse e in relazione a dati produttivi, riproduttivi e sanitari a medio-lungo termine.

In conclusione, l'ecografia non sostituisce le analisi metaboliche tradizionali, ma può ampliarne il significato diagnostico e gestionale. Inserita in un programma di monitoraggio del periodo di transizione, questa metodica può contribuire a riconoscere precocemente le bovine a rischio, migliorare la tempestività degli interventi e supportare una gestione più efficiente, preventiva e orientata al benessere della mandria.

BIBLIOGRAFIA

- Abuelo, A., Wisnieski, L., Brown, J. L., & Sordillo, L. M. (2021). Rumination time around dry-off relative to the development of diseases in early-lactation cows. *Journal of Dairy Science*, *104*(5), 5909–5920. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19782>
- Aiello, R. J., Kenna, T. M., & Herbein, J. H. (1984). Hepatic gluconeogenic and ketogenic interrelationships in the lactating cow. *Journal of Dairy Science*, *67*(8), 1707–1715. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81496-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81496-4)
- Aldrich, J. E. (2007). Basic physics of ultrasound imaging. *Critical Care Medicine*, *35*(5 Suppl.), S131–S137. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000260624.99430.22>
- Andualem, T., Alemu, B., Tintagu, T., & Berhe, N. (2017). Review on diagnostic approach of ultrasound in veterinary practice. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, *4*(8), 134–142. <https://doi.org/10.22192/ijarbs.2017.04.08.018>
- Angeli, E., Rodríguez, F. M., Rey, F., Santiago, G., Matiller, V., Ortega, H. H., & Hein, G. J. (2019). Liver fatty acid metabolism associations with reproductive performance of dairy cattle. *Animal Reproduction Science*, *208*, 106104. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.06.016>
- Arfuso, F., Minuti, A., Liotta, L., Giannetto, C., Trevisi, E., Piccione, G., & Lopreiato, V. (2023). Stress and inflammatory response of cows and their calves during peripartum and early neonatal period. *Theriogenology*, *196*, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.11.019>

- Aschenbach, J. R., Kristensen, N. B., Donkin, S. S., Hammon, H. M., & Penner, G. B. (2010). Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life*, 62(12), 869–877. <https://doi.org/10.1002/iub.400>
- Banzato, T., Fiore, E., Morgante, M., Manuali, E., & Zotti, A. (2016). Texture analysis of B-mode ultrasound images to stage hepatic lipidosis in the dairy cow: A methodological study. *Research in Veterinary Science*, 108, 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.08.007>
- Barletta, R. V., Maturana Filho, M., Carvalho, P. D., Del Valle, T. A., Netto, A. S., Rennó, F. P., Mingoti, R. D., Gandra, J. R., Mourão, G. B., Fricke, P. M., Sartori, R., Madureira, E. H., & Wiltbank, M. C. (2017). Association of changes among body condition score during the transition period with NEFA and BHBA concentrations, milk production, fertility, and health of Holstein cows. *Theriogenology*, 104, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.030>
- Barreiro-Vázquez, J. D., Miranda, M., Barreiro-Vilanova, M. I., Diéguez, F. J., & Barreiro-Lois, A. (2019). Characterization of the normal portal and hepatic blood flow of adult Holstein-Friesian cows. *Animals*, 9(6), 386. <https://doi.org/10.3390/ani9060386>
- Bekuma, A., & Galmessa, U. (2019). Combating negative effect of negative energy balance in dairy cows: Comprehensive review. *Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences*, 6(2), APDV.000633. <https://doi.org/10.31031/APDV.2019.06.000633>
- Bell, A. W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*, 73(9), 2804–2819. <https://doi.org/10.2527/1995.7392804x>

- Bell, M. J., Maak, M., Sorley, M., & Proud, R. (2018). Comparison of methods for monitoring the body condition of dairy cows. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2, 80. <https://doi.org/10.3389/sufs.2018.00080>
- Benedet, A., Manuelian, C. L., Zidi, A., Penasa, M., & De Marchi, M. (2019). Invited review: β -hydroxybutyrate concentration in blood and milk and its associations with cow performance. *Animal*, 13(8), 1676–1689. <https://doi.org/10.1017/S175173111900034X>
- Berge, A. C., & Vertenten, G. (2014). A field study to determine the prevalence, dairy herd management systems, and fresh cow clinical conditions associated with ketosis in western European dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 97(4), 2145–2154. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7163>
- Bertoni, G., & Trevisi, E. (2013). Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29(2), 413–431. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.04.004>
- Bertoni, G., Trevisi, E., Han, X., & Bionaz, M. (2008). Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3300–3310. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-0995>
- Bezerra, L. R., de Oliveira Neto, C. B., de Araújo, M. J., Edvan, R. L., de Oliveira, W. D. C., & Pereira, F. B. (2014). Major metabolic diseases affecting cows in transition period. *International Journal of Biology*, 6(3), 85–94. <https://doi.org/10.5539/ijb.v6n3p85>

- Blond, L., & Buczinski, S. (2009). Basis of ultrasound imaging and the main artifacts in bovine medicine. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25(3), 553–565. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.07.002>
- Bobe, G., Young, J. W., & Beitz, D. C. (2004). Invited review: Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3105–3124. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73446-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73446-3)
- Bönhof, J. A. (2017). Ultrasound artifacts—Part 2. *Ultraschall in der Medizin - European Journal of Ultrasound*, 38(2), 130–148. <https://doi.org/10.1055/s-0043-104216>
- Braun, U. (2009). Ultrasonography of the liver in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25(3), 591–609. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.07.003>
- Braun, U., & Gerber, D. (1994). Influence of age, breed, and stage of pregnancy on hepatic ultrasonographic findings in cows. *American Journal of Veterinary Research*, 55(9), 1201–1205.
- Braun, U., & Krüger, S. (2013). Ultrasonography of the spleen, liver, gallbladder, caudal vena cava and portal vein in healthy calves from birth to 104 days of age. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55, 68. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-68>
- Breda, J. C. dos S., Facury Filho, E. J., Flaiban, K. K. da C., & Lisboa, J. A. N. (2023). Effect of parity, body condition score at calving, and milk yield on the metabolic profile of Gyr cows in the transition period. *Animals*, 13(15), 2509. <https://doi.org/10.3390/ani13152509>

- Brethour, J. R. (1992). The repeatability and accuracy of ultrasound in measuring backfat of cattle. *Journal of Animal Science*, 70(4), 1039–1044. <https://doi.org/10.2527/1992.7041039x>
- Busato, A., Faissler, D., Küpfer, U., & Blum, J. W. (2002). Body condition scores in dairy cows: Associations with metabolic and endocrine changes in healthy dairy cows. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 49(9), 455–460. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2002.00476.x>
- Caixeta, L. S., & Omontese, B. O. (2021). Monitoring and improving the metabolic health of dairy cows during the transition period. *Animals*, 11(2), 352. <https://doi.org/10.3390/ani11020352>
- Cheng, W. W., Cheng, J. H., Sun, D. W., & Pu, H. B. (2015). Marbling analysis for evaluating meat quality: Methods and techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 523–535. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12149>
- Çolakoğlu, H. E., Yazlık, M. O., Pekcan, M., Kaya, U., Kaçar, C., Vural, M. R., Kurt, S., Yildirim, M. M., Bas, A., & Küplülü, Ş. (2019). Impact of prepartum body condition score loss on metabolic status during the transition period and subsequent fertility in Brown Swiss dairy cows. *Journal of Veterinary Research*, 63(3), 375–382. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0039>
- Constable, P. D., Hinchcliff, K. W., Done, S. H., & Grünberg, W. (2017). *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats* (11th ed.). Elsevier.
- Contreras, G. A., & Sordillo, L. M. (2011). Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology*,

- Microbiology and Infectious Diseases*, 34(3), 281–289.
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.01.004>
- Doepel, L., Lapierre, H., & Kennelly, J. J. (2002). Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake. *Journal of Dairy Science*, 85(9), 2315–2334. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74312-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74312-9)
- Domecq, J. J., Skidmore, A. L., Lloyd, J. W., & Kaneene, J. B. (1995). Validation of body condition scores with ultrasound measurements of subcutaneous fat of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 78(10), 2308–2313. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76857-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76857-6)
- Drackley, J. K. (1999). Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *Journal of Dairy Science*, 82(11), 2259–2273. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75474-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75474-3)
- Drackley, J. K., Richard, M. J., Beitz, D. C., & Young, J. W. (1992). Metabolic changes in dairy cows with ketonemia in response to feed restriction and dietary 1,3-Butanediol. *Journal of Dairy Science*, 75(6), 1622–1634. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77919-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77919-3)
- Du, X., Liu, G., Loores, J. J., Fang, Z., Bucktrout, R., Yang, Y., Ye, Q., Shi, Z., Shen, T., Wang, X., Peng, Z., Zhao, C., Lv, B., Xing, D., Zhu, Y., Li, X., & Li, X. (2018). Impaired hepatic autophagic activity in dairy cows with severe fatty liver is associated with inflammation and reduced liver function. *Journal of Dairy Science*, 101(12), 11175–11185. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15120>
- Duffield, T. (2000). Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(2), 231–253. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30103-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30103-1)

- Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T., & Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 72(1), 68–78. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79081-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0)
- Elshafey, B. G., Elfadadny, A., Metwally, S., Saleh, A. G., Ragab, R. F., Hamada, R., Mandour, A. S., Hendawy, A. O., Alkazmi, L., Ogaly, H. A., & Batiha, G. E.-S. (2023). Association between biochemical parameters and ultrasonographic measurement for the assessment of hepatic lipidosis in dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, 22(1), 136–147. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2023.2170284>
- Emerson, M. R., Woerner, D. R., Belk, K. E., & Tatum, J. D. (2013). Effectiveness of USDA instrument-based marbling measurements for categorizing beef carcasses according to differences in longissimus muscle sensory attributes. *Journal of Animal Science*, 91(2), 1024–1034. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5514>
- Fabbri, G., Giancesella, M., Gallo, L., Morgante, M., Contiero, B., Muraro, M., Boso, M., & Fiore, E. (2021). Application of ultrasound images texture analysis for the estimation of intramuscular fat content in the longissimus thoracis muscle of beef cattle after slaughter: A methodological study. *Animals*, 11(4), 1117. <https://doi.org/10.3390/ani11041117>
- Fiore, E., Fabbri, G., Gallo, L., Morgante, M., Muraro, M., Boso, M., & Giancesella, M. (2020). Application of texture analysis of B-mode ultrasound images for the quantification and prediction of intramuscular fat in living beef cattle: A methodological study. *Research in Veterinary Science*, 131, 254–258. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.020>

- Fiore, E., Perillo, L., Morgante, M., Giudice, E., Contiero, B., Curone, G., Manuali, E., Pavone, S., Piccione, G., & Ganesella, M. (2018). Ultrasonographic measurement of liver, portal vein, hepatic vein and perivisceral adipose tissue in high-yielding dairy cows with fatty liver during the transition period. *Journal of Dairy Research*, 85(4), 431–438. <https://doi.org/10.1017/S0022029918000754>
- Fiore, F., Fiore, E., Contiero, B., & Lisuzzo, A. (2025). Ultrasound back-fat thickness association with risk of metabolic disease of dairy cows in early lactation. *Animals*, 15(6), 883. <https://doi.org/10.3390/ani15060883>
- Fontes, P. L. P., & Oosthuizen, N. (2022). Applied use of Doppler ultrasonography in bovine reproduction. *Frontiers in Animal Science*, 3, 912854. <https://doi.org/10.3389/fanim.2022.912854>
- Fulton, R. M. (2014). Focused—basic ultrasound principles and artifacts. In G. R. Lisciandro (Ed.), *Focused ultrasound techniques for the small animal practitioner* (pp. 1–16). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118760772.ch1>
- Garnsworthy, P. C. (2007). Body condition score in dairy cows: Targets for production and fertility. In P. C. Garnsworthy & J. Wiseman (Eds.), *Recent advances in animal nutrition 2006* (pp. 61–86). Nottingham University Press. <https://doi.org/10.5661/recadv-06-61>
- Giannuzzi, D., Tessari, R., Pegolo, S., Fiore, E., Ganesella, M., Trevisi, E., Ajmone Marsan, P., Premi, M., Piccioli-Cappelli, F., Tagliapietra, F., Gallo, L., Schiavon, S., Bittante, G., & Cecchinato, A. (2021). Associations between ultrasound measurements and hematochemical parameters for the assessment of

- liver metabolic status in Holstein–Friesian cows. *Scientific Reports*, 11(1), 16314. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95538-x>
- Goff, J. P., Reinhardt, T. A., & Horst, R. L. (1995). Milk fever and dietary cation-anion balance effects on concentration of vitamin d receptor in tissue of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2388–2394. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76867-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76867-9)
- González, F. D., Muiño, R., Pereira, V., Campos, R., & Benedito, J. L. (2011). Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. *Journal of Veterinary Science*, 12(3), 251. <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.3.251>
- Gordon, J. L., LeBlanc, S. J., & Duffield, T. F. (2013). Ketosis treatment in lactating dairy cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29(2), 433–445. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.001>
- Greiner, S. P., Rouse, G. H., Wilson, D. E., Cundiff, L. V., & Wheeler, T. L. (2003). The relationship between ultrasound measurements and carcass fat thickness and longissimus muscle area in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 81(3), 676–682. <https://doi.org/10.2527/2003.813676x>
- Grogan, S. P., & Mount, C. A. (2023). Ultrasound physics and instrumentation. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Gross, J. J., Schwarz, F. J., Eder, K., van Dorland, H. A., & Bruckmaier, R. M. (2013). Liver fat content and lipid metabolism in dairy cows during early lactation and during a mid-lactation feed restriction. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 5008–5017. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6245>

- Gruber, S., Rienesl, L., Köck, A., Egger-Danner, C., & Sölkner, J. (2023). Importance of mid-infrared spectra regions for the prediction of mastitis and ketosis in dairy cows. *Animals*, 13(7), 1193. <https://doi.org/10.3390/ani13071193>
- Grummer, R. R. (1993). Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 76(12), 3882–3896. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77729-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77729-2)
- Hailay, T., Hoelker, M., Poirier, M., Gebremedhn, S., Rings, F., Saeed-Zidane, M., Salilew-Wondim, D., Dauben, C., Tholen, E., Neuhoﬀ, C., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2019). Extracellular vesicle-coupled miRNA profiles in follicular fluid of cows with divergent post-calving metabolic status. *Scientific Reports*, 9(1), 12851. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49029-9>
- Hatfield, C., Tulley, W., Hall, R., Griﬃths, B. E., Foskolos, A., Smith, R. F., & Oikonomou, G. (2022). A prospective cohort study on the periparturient muscle tissue mobilisation in high producing dairy cows. *Animals*, 12(14), 1772. <https://doi.org/10.3390/ani12141772>
- Herdt, T. H. (2000). Ruminant adaptation to negative energy balance. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(2), 215–230. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30102-X](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30102-X)
- Hindi, A., Peterson, C., & Barr, R. G. (2013). Artifacts in diagnostic ultrasound. *Reports in Medical Imaging*, 6, 29–48. <https://doi.org/10.2147/RMI.S33464>
- Hoskins, P., Martin, K., & Thrush, A. (Eds.). (2019). *Diagnostic ultrasound: Physics and equipment* (3rd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781138893603>
- Imhasly, S., Naegeli, H., Baumann, S., von Bergen, M., Luch, A., Jungnickel, H., Potratz, S., & Gerspach, C. (2014). Metabolomic biomarkers correlating with

- hepatic lipidosis in dairy cows. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 122.
<https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-122>
- Jankovic, D., & Peng, P. (Eds.). (2022). *Regional nerve blocks in anesthesia and pain therapy: Imaging-guided and traditional techniques* (5th ed.). Springer.
<https://doi.org/10.1007/978-3-030-88727-8>
- Jaurena, G., & Moorby, J. M. (2017). Lactation and body composition responses to fat and protein supplies during the dry period in under-conditioned dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(2), 1107–1121. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11012>
- Jorritsma, R., Wensing, T., Kruip, T. A. M., Vos, P. L. A. M., & Noordhuizen, J. P. T. M. (2003). Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Veterinary Research*, 34(1), 11–26.
<https://doi.org/10.1051/vetres:2002054>
- Joseph, A. E. A., Dewbury, K. C., & McGuire, P. G. (1979). Ultrasound in the detection of chronic liver disease (the “bright liver”). *The British Journal of Radiology*, 52(615), 184–188. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-52-615-184>
- Kalaitzakis, E., Roubies, N., Panousis, N., Pourliotis, K., Kaldrymidou, E., & Karatzias, H. (2007). Clinicopathologic evaluation of hepatic lipidosis in periparturient dairy cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(4), 835–845.
<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb03029.x>
- Kerr, D. M., & Middleton, W. D. (2020). Reflections on the ultrasound mirror image artifact. *Ultrasound Quarterly*, 36(4), 287–299.
<https://doi.org/10.1097/RUQ.0000000000000525>
- Kessel, S., Stroehl, M., Meyer, H. H. D., Hiss, S., Sauerwein, H., Schwarz, F. J., & Bruckmaier, R. M. (2008). Individual variability in physiological adaptation to

- metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions. *Journal of Animal Science*, 86(11), 2903–2912.
<https://doi.org/10.2527/jas.2008-1016>
- Kossoff, G. (2000). Basic physics and imaging characteristics of ultrasound. *World Journal of Surgery*, 24(2), 134–142. <https://doi.org/10.1007/s002689910026>
- Kremkau, F. W., & Taylor, K. J. W. (1986). Artifacts in ultrasound imaging. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 5(4), 227–237.
<https://doi.org/10.7863/jum.1986.5.4.227>
- Laugier, P., & Haïat, G. (Eds.). (2011). *Bone quantitative ultrasound*. Springer.
<https://doi.org/10.1007/978-94-007-0017-8>
- Lawrence, J. P. (2007). Physics and instrumentation of ultrasound. *Critical Care Medicine*, 35(8 Suppl.), S314–S322.
<https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000270241.33075.60>
- LeBlanc, S. J., Lissemore, K. D., Kelton, D. F., Duffield, T. F., & Leslie, K. E. (2006). Major advances in disease prevention in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1267–1279. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72195-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72195-6)
- LeBlanc, S. (2010). Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development*, 56(S), S29–S35.
<https://doi.org/10.1262/jrd.1056S29>
- Lee, H.-J., Koh, Y. J., Kim, Y.-K., Lee, S. H., Lee, J. H., & Seo, D. W. (2022). MSENNet: Marbling score estimation network for automated assessment of Korean beef. *Meat Science*, 188, 108784. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108784>
- Leighton, T. G. (2007). What is ultrasound? *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 93(1–3), 3–83. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.026>

- Lisciandro, G. R. (Ed.). (2014). *Focused ultrasound techniques for the small animal practitioner*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118760772>
- Littmann, L. (2021). Electrocardiographic artifact. *Journal of Electrocardiology*, 64, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2020.11.006>
- Loiklung, C., Sukon, P., & Thamrongyoswittayakul, C. (2022). Global prevalence of subclinical ketosis in dairy cows: A systematic review and meta-analysis. *Research in Veterinary Science*, 144, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.01.003>
- Maltz, E. (2020). Individual dairy cow management: Achievements, obstacles and prospects. *Journal of Dairy Research*, 87(2), 145–157. <https://doi.org/10.1017/S0022029920000382>
- Mann, S., Abuelo, A., Nydam, D. V., Leal Yepes, F. A., Overton, T. R., & Wakshlag, J. J. (2016). Insulin signaling and skeletal muscle atrophy and autophagy in transition dairy cows either overfed energy or fed a controlled energy diet prepartum. *Journal of Comparative Physiology B*, 186(4), 513–525. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-0969-1>
- McArt, J. A. A., Nydam, D. V., Ospina, P. A., & Oetzel, G. R. (2011). A field trial on the effect of propylene glycol on milk yield and resolution of ketosis in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science*, 94(12), 6011–6020. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4463>
- Melendez, P., & Pinedo, P. (2024). Update on fatty liver in dairy cattle with major emphasis on epidemiological patterns, pathophysiology in relationship to abdominal adiposity, and early diagnosis. *Dairy*, 5(4), 672–687. <https://doi.org/10.3390/dairy5040050>

- Melendez, P., & Serrano, M. V. (2024). Update on ketosis in dairy cattle with major emphasis on subclinical ketosis and abdominal adiposity. *Veterinary Medicine and Science*, 10(5), e1525. <https://doi.org/10.1002/vms3.1525>
- Melendez, P., Whitney, M., Williams, F., Pinedo, P., Manriquez, D., Moore, S. G., Lucy, M. C., Pithua, P., & Poock, S. E. (2018). Technical note: Evaluation of fine needle aspiration cytology for the diagnosis of fatty liver in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4483–4490. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13346>
- Meola, M. (2008). Principi fisici dell'ecografia: Natura e caratteristiche fisiche degli ultrasuoni. In *Ecografia clinica e color Doppler in nefrologia* (pp. 1–52). Eureka.
- Mezzetti, M., Cattaneo, L., Passamonti, M. M., Lopreiato, V., Minuti, A., & Trevisi, E. (2021). The transition period updated: A review of the new insights into the adaptation of dairy cows to the new lactation. *Dairy*, 2(4), 617–636. <https://doi.org/10.3390/dairy2040048>
- Mostert, P. F., van Middelaar, C. E., Bokkers, E. A. M., & de Boer, I. J. M. (2018). The impact of subclinical ketosis in dairy cows on greenhouse gas emissions of milk production. *Journal of Cleaner Production*, 171, 773–782. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.019>
- Muça, M., Currò, F., Sachs, C., & Campo, I. (2021). Grayscale ultrasound artifacts. In A. Granata & M. Bertolotto (Eds.), *Imaging in nephrology* (pp. 25–42). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-60794-4_2
- Mulligan, F. J., & Doherty, M. L. (2008). Production diseases of the transition cow. *The Veterinary Journal*, 176(1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.018>

- Oetzel, G. R. (2004). Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20(3), 651–674. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.006>
- Ospina, P. A., Nydam, D. V., Stokol, T., & Overton, T. R. (2010). Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1596–1603. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2852>
- Pascottini, O. B., Leroy, J. L. M. R., & Opsomer, G. (2020). Metabolic stress in the transition period of dairy cows: Focusing on the prepartum period. *Animals*, 10(8), 1419. <https://doi.org/10.3390/ani10081419>
- Patey, S. J., & Corcoran, J. P. (2021). Physics of ultrasound. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 22(1), 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2020.11.012>
- Peek, S. F., & Divers, T. J. (2018). *Rebhun's diseases of dairy cattle* (3rd ed.). Elsevier.
- Perkins, T. L., Green, R. D., & Hamlin, K. E. (1992). Evaluation of ultrasonic estimates of carcass fat thickness and longissimus muscle area in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 70(4), 1002–1010. <https://doi.org/10.2527/1992.7041002x>
- Piantoni, P., & Allen, M. S. (2015). Evaluation of propylene glycol and glycerol infusions as treatments for ketosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5429–5439. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9476>
- Piazza, M., Giannuzzi, D., Tessari, R., Fiore, E., Ganesella, M., Pegolo, S., Schiavon, S., Trevisi, E., Piccioli-Cappelli, F., Cecchinato, A., & Gallo, L. (2022). Associations between ultrasound hepatic measurements, body measures, and milk production traits in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 105(8), 7111–7124. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21582>

- Prabhu, S. J., Kanal, K., Bhargava, P., Vaidya, S., & Dighe, M. K. (2014). Ultrasound artifacts: Classification, applied physics with illustrations, and imaging appearances. *Ultrasound Quarterly*, 30(2), 145–157. <https://doi.org/10.1097/RUQ.0b013e3182a80d34>
- Proios, I., & Grünberg, W. (2023). Preoperative and surgical predictors of the treatment outcome of dairy cows with right abomasal displacement—A retrospective study of 234 cases. *Animals*, 13(18), 2887. <https://doi.org/10.3390/ani13182887>
- Puppel, K., & Kuczyńska, B. (2016). Metabolic profiles of cow's blood; a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4321–4328. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7779>
- Raboisson, D., Mounié, M., & Maigné, E. (2014). Diseases, reproductive performance, and changes in milk production associated with subclinical ketosis in dairy cows: A meta-analysis and review. *Journal of Dairy Science*, 97(12), 7547–7563. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8237>
- Rajala-Schultz, P. J., Gröhn, Y. T., & McCulloch, C. E. (1999). Effects of milk fever, ketosis, and lameness on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82(2), 288–294. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75235-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75235-5)
- Rantanen, N. W., & Ewing, R. L. (1981). Principles of ultrasound application in animals. *Veterinary Radiology*, 22(5), 196–203. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.1981.tb01373.x>
- Rizzatto, G. (1998). Ultrasound transducers. *European Journal of Radiology*, 27(Suppl. 2), S188–S195. [https://doi.org/10.1016/S0720-048X\(98\)00061-8](https://doi.org/10.1016/S0720-048X(98)00061-8)
- Roche, J. R., Friggens, N. C., Kay, J. K., Fisher, M. W., Stafford, K. J., & Berry, D. P. (2009). Invited review: Body condition score and its association with dairy cow

- productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 5769–5801.
<https://doi.org/10.3168/jds.2009-2431>
- Rousing, T., Holm, J. R., Krogh, M. A., & Østergaard, S. (2020). Expert-based development of a generic HACCP-based risk management system to prevent critical negative energy balance in dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 175, 104849. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104849>
- Ryder, J., Smith, R. F., & Neary, J. M. (2023). Postpartum longissimus dorsi muscle loss, but not back fat, is associated with resumption of postpartum ovarian activity in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 106(11), 8087–8097.
<https://doi.org/10.3168/jds.2023-23253>
- Salimi Kenari, A., Chalmeh, A., Pourjafar, M., Mohtashamifar, M. A., Amirian, A., & Khedri, A. (2024). Potential relationships between apelin and metabolic-associated indices in transition dairy cows. *Tropical Animal Health and Production*, 56(6), 209. <https://doi.org/10.1007/s11250-024-04043-6>
- Saradhi, K. P., Sandilya, A., Sravya, R. N. S., & Vijayalakshmi, P. (2024). Ketosis in dairy cattle: A comprehensive review. *International Journal of Advanced Biochemistry Research*, 8(12S), 1008–1015.
<https://doi.org/10.33545/26174693.2024.v8.i12Sm.3264>
- Schmidtman, C., Mugambe, J., Blaj, I., Harms, C., & Thaller, G. (2024). Genetic investigations on backfat thickness and body condition score in German Holstein cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 141(6), 602–613.
<https://doi.org/10.1111/jbg.12867>
- Schröder, U. J., & Staufenbiel, R. (2006). Invited review: Methods to determine body fat reserves in the dairy cow with special regard to ultrasonographic

- measurement of backfat thickness. *Journal of Dairy Science*, 89(1), 1–14.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72064-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72064-1)
- Siachos, N., Oikonomou, G., Panousis, N., Banos, G., Arsenos, G., & Valergakis, G. E. (2021). Association of body condition score with ultrasound measurements of backfat and longissimus dorsi muscle thickness in periparturient Holstein cows. *Animals*, 11(3), 818. <https://doi.org/10.3390/ani11030818>
- Smith, M. T., Oltjen, J. W., Dolezal, H. G., Gill, D. R., & Behrens, B. D. (1992). Evaluation of ultrasound for prediction of carcass fat thickness and longissimus muscle area in feedlot steers. *Journal of Animal Science*, 70(1), 29–37.
<https://doi.org/10.2527/1992.70129x>
- Sordillo, L. M., & Raphael, W. (2013). Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29(2), 267–278.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.002>
- Spattini, G. (2008). Gli artefatti in ecografia veterinaria: Come riconoscerli e correggerli. *Veterinaria*, 22, 9–20.
- Starke, A., Haudum, A., Weijers, G., Herzog, K., Wohlsein, P., Beyerbach, M., de Korte, C. L., Thijssen, J. M., & Rehage, J. (2010). Noninvasive detection of hepatic lipidosis in dairy cows with calibrated ultrasonographic image analysis. *Journal of Dairy Science*, 93(7), 2952–2965. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2684>
- Stefani, A., Casu, A., & Moro, L. (2011). *Guida pratica all'interpretazione dei parametri di chimica-clinica nella bovina da latte* (1st ed.). Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.
<https://www.izsvenezie.it/documenti/comunicazione/materiale-editoriale/2-manuali/parametri-chimica-clinica-bovina-da-latte.pdf>

- Stojević, Z., Piršljin, J., Milinković-Tur, S., Zdelar-Tuk, M., & Ljubić, B. B. (2005). Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period. *Veterinarski Arhiv*, 75(1), 67–73.
- Streeter, R. N., & Step, D. L. (2007). Diagnostic ultrasonography in ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 23(3), 541–574.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.07.008>
- Swecker, W. S. (2014). Trace mineral feeding and assessment. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 30(3), 671–688.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.07.008>
- Szabo, T. L., & Lewin, P. A. (2013). Ultrasound transducer selection in clinical imaging practice. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 32(4), 573–582.
<https://doi.org/10.7863/jum.2013.32.4.573>
- Taio, G., Lisuzzo, A., Bordin, S., Giancesella, M., Andrighetto, I., Marchesini, G., & Fiore, E. (2025). Field evaluation of liver ultrasound measurements and biochemical and metabolic parameters during the transition period in dairy cows. *Animals*, 15(14), 2013. <https://doi.org/10.3390/ani15142013>
- Tatone, E. H., Duffield, T. F., LeBlanc, S. J., DeVries, T. J., & Gordon, J. L. (2017). Investigating the within-herd prevalence and risk factors for ketosis in dairy cattle in Ontario as diagnosed by the test-day concentration of β -hydroxybutyrate in milk. *Journal of Dairy Science*, 100(2), 1308–1318.
<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11453>
- Toscano, A., Giannuzzi, D., Pegolo, S., Vanzin, A., Bisutti, V., Gallo, L., Trevisi, E., Cecchinato, A., & Schiavon, S. (2023). Associations between the detailed milk mineral profile, milk composition, and metabolic status in Holstein cows.

Journal of Dairy Science, 106(9), 6577–6591. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-23161>

- Tufarelli, V., Colonna, M. A., Losacco, C., & Puvača, N. (2023). Biological health markers associated with oxidative stress in dairy cows during lactation period. *Metabolites*, 13(3), 405. <https://doi.org/10.3390/metabo13030405>
- Valergakis, G. E., Oikonomou, G., Arsenos, G., & Banos, G. (2011). Phenotypic association between energy balance indicators and reproductive performance in primiparous Holstein cows. *Veterinary Record*, 168(7), 189. <https://doi.org/10.1136/vr.c6259>
- van der Drift, S. G. A., Houweling, M., Schonewille, J. T., Tielens, A. G. M., & Jorritsma, R. (2012). Protein and fat mobilization and associations with serum β -hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 4911–4920. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4771>
- van Knegsel, A. T. M., van den Brand, H., Dijkstra, J., van Straalen, W. M., Heetkamp, M. J. W., Tamminga, S., & Kemp, B. (2007). Dietary energy source in dairy cows in early lactation: Energy partitioning and milk composition. *Journal of Dairy Science*, 90(3), 1467–1476. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71632-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71632-6)
- Vargas, A., Amescua-Guerra, L. M., Bernal, M. A., & Pineda, C. (2008). Principios físicos básicos del ultrasonido, sonoanatomía del sistema musculoesquelético y artefactos ecográficos. *Acta Ortopédica Mexicana*, 22(6), 361–373.
- Wang, H. P., Zheng, P. C., Wang, X. M., & Sang, L. (2023). Artifacts in two-dimensional shear wave elastography of liver. *World Journal of Gastroenterology*, 29(21), 3318–3327. <https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i21.3318>

- Wang, Z., Song, Y., Zhao, C., Bai, Y., Zhang, F., Xia, C., Fu, S., Zhang, H., Xu, C., & Wu, L. (2022). The relationship of negative energy balance (NEB) and energy metabolism, milk production and reproductive performance during early lactation in dairy cows in Heilongjiang, China. *Veterinarski Arhiv*, 92(3), 223–232. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.1377>
- Wankhade, P. R., Manimaran, A., Kumaresan, A., Jeyakumar, S., Ramesha, K. P., Sejian, V., Rajendran, D., & Varghese, M. R. (2017). Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: A review. *Veterinary World*, 10(11), 1367–1377. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1367-1377>
- Weber, C., Hametner, C., Tuchscherer, A., Losand, B., Kanitz, E., Otten, W., Sauerwein, H., Bruckmaier, R. M., Becker, F., Kanitz, W., & Hammon, H. M. (2013). Hepatic gene expression involved in glucose and lipid metabolism in transition cows: Effects of fat mobilization during early lactation in relation to milk performance and metabolic changes. *Journal of Dairy Science*, 96(9), 5670–5681. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6277>
- White, H. (2015). The role of TCA cycle anaplerosis in ketosis and fatty liver in periparturient dairy cows. *Animals*, 5(3), 793–802. <https://doi.org/10.3390/ani5030384>
- Williams, A. R. (2002). Ultrasound applications in beef cattle carcass research and management. *Journal of Animal Science*, 80(E-Suppl. 2), E183–E188. https://doi.org/10.2527/animalsci2002.80E-Suppl_2E183x
- Yang, W., Zhang, B., Xu, C., Zhang, H., & Xia, C. (2019). Effects of ketosis in dairy cows on blood biochemical parameters, milk yield and composition, and digestive capacity. *Journal of Veterinary Research*, 63(4), 555–560. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0059>

Zhang, G., & Ametaj, B. N. (2020). Ketosis an old story under a new approach.
Dairy, 1(1), 42–60. <https://doi.org/10.3390/dairy1010005>