

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di **Agronomia Animali Alimenti Risorse naturali e  
Ambiente**

Corso di laurea in **Scienze e Tecnologie Animali**

**La chetosi nelle vacche da latte, principali fattori di rischio e  
strategie di prevenzione**

**Relatore:**

Prof. Enrico Fiore

**Laureando:**

Nicola De Ronchi

**Matricola** n. 2007123

ANNO ACCADEMICO 2023/2024



# SOMMARIO

---

<b>Riassunto</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Introduzione</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Periodo di transizione della bovina da latte</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2 Bilancio energetico negativo</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3 Mobilizzazione delle riserve lipidiche</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4 Patologie dirette e indirette indotte dal bilancio energetico negativo</b> .....	<b>10</b>
<b>1.4.1 Insulinoresistenza</b> .....	<b>10</b>
<b>1.4.2 Lipidosi epatica</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4.3 SARA</b> .....	<b>14</b>
<b>1.4.4 Disturbi della fertilità</b> .....	<b>17</b>
<b>1.4.5 Immunosoppressione</b> .....	<b>20</b>
<b>2 Chetosi</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 Metabolismo dei corpi chetonici</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2 Eziologia e fisiopatologia</b> .....	<b>25</b>
<b>2.3 Presentazione clinica</b> .....	<b>29</b>
<b>2.4 Incidenza e impatto economico della chetosi</b> .....	<b>33</b>
<b>3 Approcci diagnostici e Biomarcatori</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1 Catalisi enzimatica</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2 Spettrometria infrarossa con trasformata di Fourier (FTIR)</b> .....	<b>37</b>
<b>3.3 Fluorimetria</b> .....	<b>38</b>
<b>3.4 Cromatografia gas-liquido (GLC), spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) e gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS)</b> .....	<b>38</b>
<b>3.5 Cow-side Tests</b> .....	<b>39</b>

3.5.1	Cow-side test nelle urine.....	39
3.5.2	Cow-side test nel latte.....	40
3.5.3	Cow-side test sul sangue .....	40
3.6	Altri test disponibili per la diagnosi di chetosi .....	41
3.6.1	Rapporto Grasso/Proteine (F/P) .....	41
3.6.2	Contenuto di urea nel latte .....	43
3.6.3	Profilo degli acidi grassi nel latte.....	43
3.6.4	NEFA nel sangue.....	44
4	Trattamento e prevenzione della chetosi .....	46
4.1	Terapia.....	46
4.2	Prevenzione .....	50
4.2.1	Attività ruminale .....	50
4.2.2	BCS .....	51
4.2.3	Nutrizione.....	52
4.2.4	Management.....	55
5	Conclusioni .....	57
6	Bibliografia .....	58

# RIASSUNTO

---

Subito dopo il parto, le vacche hanno bisogno di maggiori quantità di energia e, pertanto, devono mangiare di più per soddisfare queste esigenze. Per avviare e mantenere la produzione di latte, sono necessarie ingenti quantità di energia e, se il regime alimentare non è in grado di fornirle, l'animale inizia a bruciare le riserve di grasso corporeo. Questo processo porta al rilascio di chetoni nel flusso sanguigno: quando la loro concentrazione supera una certa soglia, la vacca entra in uno stato di chetosi. La chetosi rappresenta una delle principali patologie metaboliche del periodo di transizione delle bovine da latte, e costituisce un problema per le sue ricadute sull'intero organismo, in particolare sul sistema riproduttivo e immunitario. La chetosi può conseguentemente causare un calo nella produzione di latte e avere effetti negativi sulla fertilità della vacca nel lungo termine, impattando significativamente sul bilancio aziendale e sul benessere degli animali stessi. In questo lavoro verrà innanzitutto analizzato il periodo di transizione della bovina al fine di comprendere meglio l'intera serie di processi che lo caratterizzano, con particolare attenzione allo stato di bilancio energetico negativo (NEB) e agli effetti diretti e indiretti che esso genera. Successivamente, ci si concentrerà sulla chetosi, esaminandone l'eziologia, la fisiopatologia, la classificazione, il peso economico e le modalità di monitoraggio di questa patologia, descrivendo i principali metodi. Infine, saranno esaminate le strategie e le corrette pratiche per il trattamento, la cura e la prevenzione della chetosi.



# ABSTRACT

---

Immediately after calving, cows need greater amounts of energy and, therefore, must eat more to meet these needs. In order to initiate and maintain milk production, large amounts of energy are required, and if the feeding regimen is unable to provide it, the animal begins to burn body fat reserves. This process leads to the release of ketones into the bloodstream: when their concentration exceeds a certain threshold, the cow enters a state of ketosis. Ketosis represents one of the main metabolic disorders of the transition period in dairy cows and is a problem because of its effects on the entire organism, particularly on the reproductive and immune systems. Ketosis can consequently cause a decline in milk production and have negative effects on the cow's fertility in the long term, significantly impacting the farm budget and the welfare of the animals themselves. In this paper, the cow's transition period will first be analyzed in order to better understand the entire set of processes that characterize it, with a focus on the negative energy balance (NEB) state and the direct and indirect effects it generates. Next, we will focus on ketosis, examining its etiology, pathophysiology, classification, economic burden and monitoring methods of this pathology, describing the main methods. Finally, strategies and proper practices for the treatment, cure, and prevention of ketosis will be examined.



# 1 INTRODUZIONE

---

## 1.1 PERIODO DI TRANSIZIONE DELLA BOVINA DA LATTE

Il periodo di transizione è definito come l'intervallo di tempo che inizia tre settimane prima del parto e finisce tre settimane dopo il parto (Redfern et al., 2021). Durante il passaggio dal periodo di asciutta alla lattazione, la vacca da latte subisce un periodo di cambiamenti fisiologici, metabolici e immunologici ed è più a rischio di sviluppare malattie, a scapito del benessere e della produzione (Drackley, 1999). Tali malattie sono:

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

Le singole malattie produttive della vacca in transizione è meglio non considerarle isolatamente. Chetosi, fegato grasso, ipocalcemia, placenta ritenuta, metrite e spostamento dell'abomaso sono tutti correlati dal punto di vista eziologico. Ad esempio, le vacche in asciutta sovracondizionate hanno maggiori probabilità di sviluppare chetosi e fegato grasso, condizioni che possono sopprimere l'immunità direttamente o attraverso un bilancio energetico eccessivamente negativo (Ingvarsen et al., 2003). Le malattie da produzione della vacca da latte sono una manifestazione dell'incapacità della vacca di far fronte alle esigenze metaboliche dell'alta produzione e continuano a essere causa di perdite economiche per l'industria lattiero-casearia e un problema di benessere animale (Mulligan and Doherty, 2008).

Genetica, alimentazione e gestione sono i principali fattori che determinano l'aumento della produzione di latte nelle moderne vacche da latte (L. H. Baumgard et al., 2017). La selezione genetica per la produzione di latte ha portato a vacche con una migliore capacità di ripartire l'energia e le proteine della dieta e delle riserve corporee per sostenere la produzione di latte invece di accumulare massa corporea (Veerkamp, 1998).

Il tasso di secrezione del latte durante i primi 2-3 mesi dopo il parto aumenta rapidamente, mentre il tasso di DMI (Dry Matter Intake) aumenta a un ritmo inferiore, raggiungendo il massimo alcune settimane dopo il picco di produzione del latte (Coppock, 1985). Pertanto, durante le prime settimane di lattazione, la vacca deve essere in grado di mobilitare energia e proteine dalle riserve corporee per compensare il divario tra assunzione e produzione (Daros et al., 2022). Il passaggio dalla gestazione al parto è associato a cambiamenti sincronizzati nel metabolismo attraverso l'omeostasi e l'omeoresi. L'omeostasi si riferisce a un meccanismo di controllo che comporta equilibrio fisiologico e l'omeoresi si riferisce a un meccanismo di controllo che implica il coordinamento del metabolismo dei tessuti corporei necessari a sostenere lo stato fisiologico. Durante la tarda gestazione e l'inizio dell'allattamento, il flusso di sostanze nutritive al feto e ai tessuti mammari ha un alto grado di priorità metabolica (Hayirli and Grummer, 2004). Anche il comportamento cambia in questo periodo, compresa la riduzione dell'assunzione di sostanza secca (DMI); quando l'apporto energetico della dieta non riesce a fornire l'energia necessaria per sostenere gli alti livelli di produzione di latte, le vacche sperimentano un bilancio energetico negativo (NEB) (Daros et al., 2022). Questi cambiamenti, insieme a una complessa risposta infiammatoria, contribuiscono all'elevata incidenza di malattie metaboliche e infettive in questo periodo (Bradford et al., 2015).

## **1.2 BILANCIO ENERGETICO NEGATIVO**

Il bilancio energetico totale dell'animale (EBal) è la differenza tra l'energia consumata con l'alimento e l'energia usata per il mantenimento e/o la produzione (di latte, carne etc.) (L. Baumgard et al., 2006). Durante gli ultimi 60 giorni di gravidanza i requisiti per la gravidanza rimangono pressoché costanti, ciò che altera il bilancio energetico della bovina è il declino del DMI, che durante le ultime 3 settimane di gestazione causa l'instaurarsi di un bilancio energetico negativo (Hayirli and Grummer, 2004), denominato NEB (Negative Energy Balance), ovvero la carenza netta di energia derivante dallo squilibrio tra l'apporto e la produzione di energia in uscita (Jorritsma et al., 2003). Tale bilancio energetico tende ad aggravarsi nelle prime settimane di lattazione perché la produzione di latte cresce ad un tasso maggior rispetto alla crescita del DMI, con picchi rispettivamente da 5 a 8 settimane e

da 12 a 15 settimane post-parto(Coppock, 1985). Il valore di NEB più basso si registra tra i 2 e 12 giorni post-parto e la condizione perdura approssimativamente fino al 72esimo giorno di lattazione (Jorritsma et al., 2003). le vacche entrano in uno stato di bilancio energetico negativo, fisiologicamente inevitabile(Grummer et al., 2004) (Figura 1).

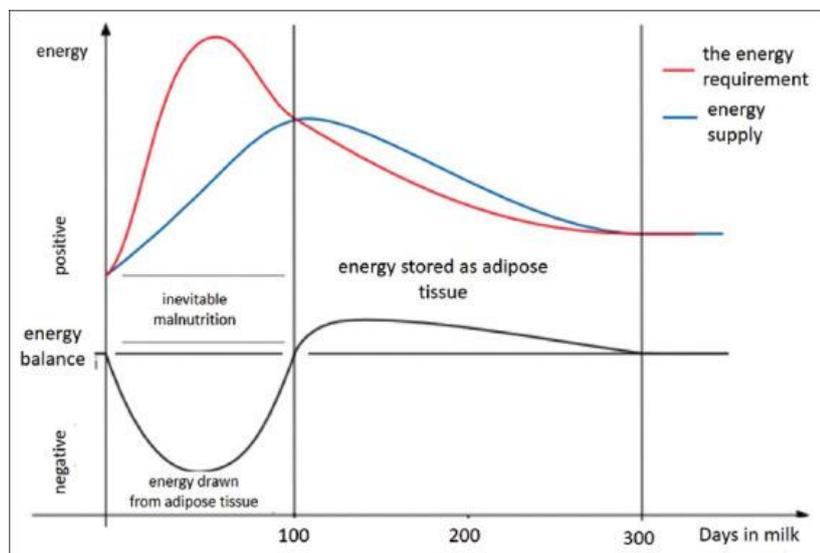


Fig.1: Il picco della produzione giornaliera di latte è tra le 4 e le 6 settimane di lattazione, mentre il picco della DMI è tra le 9 e le 11 settimane di lattazione. Questa situazione causa la NEB durante i primi 2 mesi di lattazione(Guliński, 2021).

La sfida principale che le vacche devono affrontare è l'improvviso aumento del fabbisogno di nutrienti per la produzione di latte in un momento in cui l'assunzione di sostanza secca (DMI) e l'apporto di nutrienti sono in ritardo. L'elevato fabbisogno di nutrienti per la galattofagia è accompagnato dalla mobilitazione delle riserve corporee per sostenere la produzione di latte(Esposito et al., 2014). Dopo il parto, l'inizio della sintesi del latte e il rapido aumento della produzione di latte aumentano notevolmente la richiesta di glucosio per la lattosintesi, in un momento in cui il DMI non ha raggiunto il massimo(Drackley et al., 2005). Poiché gran parte del carboidrato alimentare viene fermentato nel rumine, poco glucosio viene assorbito direttamente dal tratto digestivo. Di conseguenza, le vacche da latte si affidano ampiamente alla gluconeogenesi epatica per soddisfare il fabbisogno sistemico di glucosio(Drackley et al., 2005). La produzione di propionato derivante dal basso DMI durante il primo periodo post-parto è insufficiente per sintetizzare la quantità totale di glucosio necessaria(Drackley et al., 2001). Questo porta la bovina ad entrare in uno stato di

ipoglicemia: i valori di glucosio tendono a calare drasticamente dopo il parto fino a raggiungere un minimo durante il periodo tra la prima e la terza settimana di lattazione (K. L. Ingvarsen and Andersen, 2000). La riduzione dei livelli di glucosio porta a dei livelli di insulina circolanti minori che promuovono la mobilizzazione dei grassi tramite lipolisi; infatti, durante il periodo di NEB, il tessuto adiposo rappresenta la fonte energetica maggiore per la bovina (Sordillo and Raphael, 2013). Gli aminoacidi provenienti dalla dieta o dalla disgregazione del muscolo scheletrico e il glicerolo proveniente dal grasso corporeo mobilitato devono fornire la maggior parte della sintesi di glucosio rimanente (Reynolds et al., 2003).

### **1.3 MOBILIZZAZIONE DELLE RISERVE LIPIDICHE**

Il tessuto adiposo rappresenta la principale riserva energetica dell'organismo ed è costituito da cellule piene di trigliceridi note come adipociti (Bell, 1995). All'interno degli adipociti si verificano continuamente due processi metabolici, la lipolisi e la lipogenesi, che portano alla costante degradazione e risintesi dei trigliceridi intracellulari (J. R. Roche et al., 2009). La mobilitazione di acidi grassi dal tessuto adiposo per sostenere le richieste nutritive dell'allattamento è un fenomeno biologico naturale che si verifica nella maggior parte dei mammiferi in lattazione, orchestrato dal sistema endocrino (Mulligan and Doherty, 2008). La mobilitazione lipidica è definita come uno squilibrio tra lipogenesi e lipolisi all'interno del tessuto adiposo (Contreras and Sordillo, 2011).

Durante la lipolisi, le lipasi del tessuto adiposo, tra cui la lipasi sensibile agli ormoni, la lipasi dei trigliceridi adiposi e la lipasi del monoacilglicerolo, avviano il catabolismo dei trigliceridi in glicerolo e NEFA (Non-Esterified Fatty Acids) (Contreras and Sordillo, 2011). Il glicerolo rilasciato può essere utilizzato nella via gluconeogenica. Il suo contributo alla gluconeogenesi e, quindi, alla produzione complessiva di glucosio dipende dalle dimensioni dei depositi di grasso e dall'entità della mobilitazione dei grassi, ed è quindi direttamente correlato al bilancio energetico negativo (Drackley et al., 2001). Una volta nello spazio extracellulare, i NEFA sono trasportati nel sangue tipicamente dall'albumina, anche se una piccola parte è trasportata come monomeri non legati in soluzione acquosa (Richieri and Kleinfeld, 1995). Questi NEFA circolano nel sangue e sono disponibili come combustibili per

la maggior parte dei tessuti dell'organismo; tuttavia, il fegato ne rimuove una gran parte. Ciò rende il fegato un modulatore chiave della concentrazione di NEFA nel sangue e un regolatore della distribuzione del carburante durante la NEB. Nel fegato, i NEFA possono essere metabolizzati in corpi chetonici o riesterificati per la produzione di trigliceridi. Il fegato svolge anche un ruolo chiave nel metabolismo dei grassi e dei carburanti derivati dai grassi, soprattutto durante i periodi di NEB(Thomas H. Herdt, 2000).

Il principale punto di controllo metabolico che determina la conversione dei NEFA in corpi chetonici è il trasporto dei NEFA nei mitocondri, una fase necessaria per la produzione di corpi chetonici(Thomas H. Herdt, 2000). Gli acidi grassi non esterificati che non entrano nei mitocondri per l'ossidazione o la conversione in corpi chetonici vengono riesterificati per formare trigliceridi. Durante i periodi di intensa mobilitazione lipidica e di elevate concentrazioni di NEFA nel sangue, grandi quantità di trigliceridi possono essere sintetizzate nel fegato(T. H. Herdt et al., 1988). L'eliminazione di questi trigliceridi dal fegato richiede la sintesi e la secrezione di lipoproteine a bassissima densità, i principali vettori di trigliceridi nel sangue. Una volta incorporate nelle lipoproteine a bassissima densità e secreti nel sangue, i trigliceridi possono essere utilizzati da vari tessuti a scopo energetico o trasportati alla ghiandola mammaria per la sintesi del grasso del latte(Thomas H. Herdt, 2000).

Durante il periodo di transizione, la lipolisi è favorita da una serie di cambiamenti ormonali che includono la riduzione dei livelli plasmatici di insulina e glucosio e una ridotta sensibilità all'insulina nei tessuti adiposi e in altri tessuti periferici(Thomas H. Herdt, 2000). La lipomobilizzazione provvede a fornire l'energia per la produzione di latte, ma quando questa non è adeguatamente regolata(Sordillo and Raphael, 2013), può portare ad accumulo di elevate concentrazioni di NEFA; quest'ultimi sono correlati con diverse patologie metaboliche che si possono sviluppare nella vacca in transizione, tra cui la chetosi. Questo perché i NEFA, nel fegato, vengono metabolizzati per produrre energia attraverso la  $\beta$ -ossidazione; il risultato è la produzione di corpi chetonici: BHB, acetoacetato e acetone(Engelking, 2010). Elevate concentrazioni di BHB sono associati ad una funzione immunitaria alterata: il numero di neutrofili risulta essere minore e le loro funzioni fagocitarie e battericide tendono ad essere ridotte(Suriyasathaporn et al., 2000), esponendo

l'animale ad un maggior rischio per lo sviluppo di patologie infettive, come la mastite(Sordillo and Raphael, 2013).

L'aumento dei tassi di lipolisi ha un profondo impatto sul punteggio della condizione corporea, un'importante linea guida per la gestione delle vacche in transizione(J. R. Roche et al., 2009). Il tasso di lipomobilizzazione tende ad essere maggiore nelle bovine che si presentano al parto con un BCS(Body Condition Score)  $\geq 3.5$  (su una scala da 1 a 5), poiché possiedono una maggiore massa di tessuto adiposo(Sordillo and Raphael, 2013).Un'eccessiva riduzione del punteggio di condizione corporea è direttamente collegata a una maggiore incidenza di malattie di transizione della vacca e a una riduzione delle prestazioni della lattazione(Bewley and Schutz, 2008).

## **1.4 PATOLOGIE DIRETTE E INDIRETTE INDOTTE DAL BILANCIO ENERGETICO NEGATIVO**

### **1.4.1 Insulinoresistenza**

L'insulina è un ormone peptidico secreto dalle cellule  $\beta$  delle isole pancreatiche di Langerhans e mantiene i normali livelli di glucosio nel sangue facilitando l'assorbimento del glucosio da parte delle cellule, regolando il metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e delle proteine e promuovendo la divisione e la crescita cellulare attraverso i suoi effetti mitogeni(Wilcox, 2005).

Il glucosio non può passare la membrana plasmatica che circonda le cellule(Shepherd and Kahn, 1999). L'assorbimento del glucosio avviene attraverso due processi diversi: la diffusione facilitata e il cotrasporto. La maggior parte delle cellule, tuttavia, assume il glucosio per diffusione facilitata attraverso le molecole trasportatrici di glucosio (GLUT). L'assorbimento del glucosio attraverso questi GLUT è fondamentalmente guidato dalla differenza di concentrazione di glucosio tra il fluido extracellulare e quello intracellulare(De Koster and Opsomer, 2013).

L'insulino-resistenza (IR) è stata definita come uno stato in cui un livello normale di insulina è associato a una risposta ridotta nei tessuti insulino-sensibili(Youssef and El-Ashker, 2017). Dopo il parto, le vacche subiscono un periodo transitorio di IR per privilegiare l'assorbimento insulino-indipendente di glucosio da parte della ghiandola mammaria al fine di migliorare la

produzione di latte(De Koster and Opsomer, 2013). È un adattamento omeoretico che permette di fornire un adeguato apporto di glucosio all'utero gravido e alla ghiandola mammaria(De Koster and Opsomer, 2013). Il meccanismo di insulino-resistenza si esprime attraverso: una diminuzione della produzione di insulina e/o un aumento della sua degradazione; un'alterazione dell'interazione dell'insulina con i suoi recettori, in particolare una diminuzione di questi e una diminuzione dell'affinità di legame; anomalie nella segnalazione intracellulare e la traslocazione dei recettori per il glucosio (GLUT)(Hayirli, 2006).

È necessario fare una distinzione tra insulino-resistenza e carenza di secrezione di insulina. La resistenza all'insulina è determinata dalla risposta dei tessuti insulino-sensibili a una normale concentrazione di insulina. La secrezione di insulina è determinata dalla capacità secretoria del pancreas in risposta a un fattore che stimola la secrezione di insulina. (De Koster and Opsomer, 2013). Il periodo di IR nei bovini da latte in transizione ha elementi in comune con il diabete umano di tipo 1 e di tipo 2, ma si differenzia per il fatto che le vacche hanno un livello più basso di glucosio nel sangue(Youssef and El-Ashker, 2017). Una carente secrezione di insulina non comporta un alterato stato di insulino-resistenza.

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

Quello che accade è che la concentrazione di insulina plasmatica diminuisce drasticamente con l'avvicinarsi del parto e rimane bassa nella prima settimana postpartum. La concentrazione di somatotropina plasmatica, conosciuta anche come ormone della crescita (GH), aumenta drasticamente e rapidamente dopo il parto. Questa diminuzione dell'insulina, combinata con una diminuzione della sensibilità del tessuto adiposo all'insulina e con l'aumento della somatotropina, determina una diminuzione della sintesi dei trigliceridi

nell'adipe e ne favorisce la mobilizzazione(Bell, 1995).Pertanto, un conseguente aumento dei NEFA plasmatici al momento del parto. La somatotropina, di concerto con il cortisolo, stimola il fegato a produrre più glucosio(E. Block, 2010).

### **1.4.2 Lipidosi epatica**

La lipidosi epatica (HL), fegato grasso o sindrome della vacca grassa, si verifica principalmente durante le prime settimane di lattazione nelle vacche da latte, ma può essere già pronunciata poco prima o al momento del parto(Grummer, 1993). A causa della carenza energetica prevalente all'inizio della lattazione, imposta dalla mancanza di assunzione di mangime a fronte di un fabbisogno elevato, il tessuto adiposo viene mobilizzato e le concentrazioni di acidi grassi non esterificati (NEFA) aumentano nel sangue. Quando l'assorbimento epatico supera la capacità di esportazione e di ossidazione, i lipidi si accumulano sotto forma di triacilgliceridi (TAG)(Josef J. Gross, 2023). Di conseguenza, varie funzioni e attività del fegato sono ridotte o compromesse(Drackley, 1999).

Soprattutto a causa del notevole aumento della produzione di latte negli ultimi anni, i fattori che contribuiscono all'entità della lipomobilizzazione durante il bilancio energetico negativo aggravano ulteriormente l'espressione della lipidosi epatica, con conseguenti alti tassi di incidenza(Josef J. Gross, 2023). Negli ultimi 40-50 anni, la produzione media di latte per vacca è più che raddoppiata in molti Paesi. Di conseguenza, un numero considerevole di vacche da latte è affetto da disturbi di salute che sono principalmente associati all'alto livello di performance e ai relativi fallimenti dell'adattamento metabolico e immunologico(Capper et al., 2009).

In contrasto con il rapido aumento della richiesta di nutrienti ed energia per la produzione di latte, la concomitante assunzione di mangime aumenta lentamente dopo il parto(J. Gross et al., 2011a), mentre verso la fine della lattazione e durante il periodo di asciutta esiste un rischio di sovracondizionamento. Di conseguenza, le vacche devono affrontare una notevole carenza energetica durante le prime settimane di lattazione, fino a quando l'assunzione di mangime non riesce a soddisfare il fabbisogno energetico per il mantenimento e la lattazione(Drackley, 1999; J. J. Gross and Bruckmaier, 2019). Per compensare il temporaneo bilancio energetico negativo (NEB), le vacche mobilitano le riserve corporee

(prevalentemente tessuto adiposo) fino al raggiungimento del picco della lattazione, per ricostituire e accumulare nuovamente le riserve corrispondenti in seguito. Pertanto, il NEB prevalente che innesca la lipolisi espone le vacche ad alta produzione allo stress metabolico già al momento del parto (Leblanc, 2010). Durante il periodo di transizione, le vacche sono altamente suscettibili di sviluppare malattie metaboliche e patologie correlate, come chetosi, lipidosi epatica, placenta ritenuta, mastite, abomaso dislocato, laminite o problemi di riproduzione (K. L. Ingvarsen et al., 2003). Una vacca affetta può entrare in un circolo vizioso, in quanto i disturbi post-partum sono correlati tra loro e un disturbo metabolico può predisporre la vacca ad altri disturbi (Josef J. Gross, 2023).

Durante l'inizio della lattazione i lipidi diventano un carburante metabolico alternativo. Per far fronte all'aumento del fabbisogno di acidi grassi come fonte di energia e per la sintesi del grasso del latte, le riserve lipidiche corporee vengono mobilitate (lipomobilizzazione) attraverso la lipolisi. I NEFA mobilizzati entrano nel fegato, dove vengono normalmente metabolizzati in presenza di ossalacetato dopo essere stati attivati dal legame con l'acetil-coenzima A (acetil-CoA), liberando così energia (fig. 2) (Josef J. Gross, 2023).

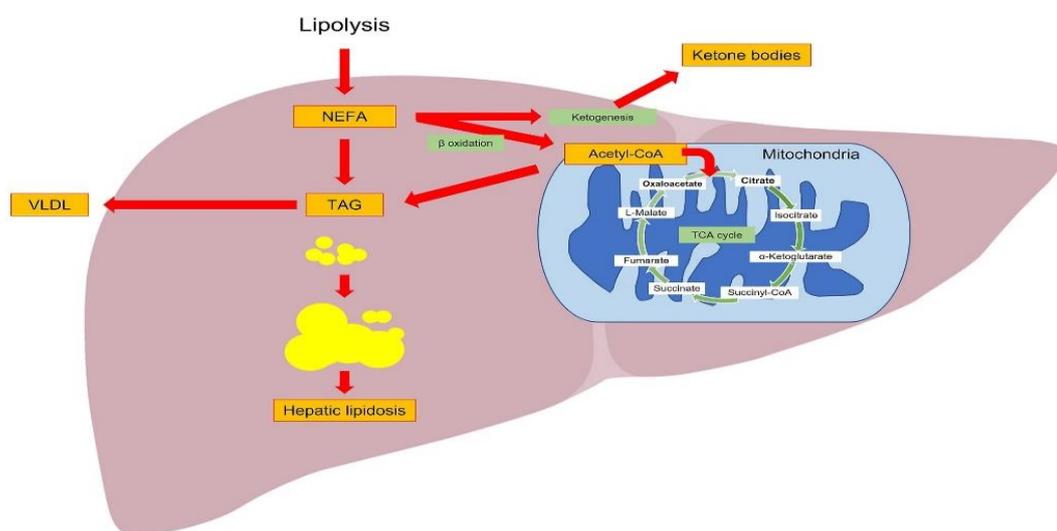


Figura 2: Metabolismo degli acidi grassi mobilizzati nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) e sviluppo della lipidosi epatica (Josef J. Gross, 2023).

Gli acidi grassi a lunga catena (LCFA) all'interno degli epatociti possono andare in contro a diverse vie metaboliche: vengono ossidati completamente generando adenosina trifosfato (ATP: Adenosine triphosphate) oppure parzialmente generando acetato e corpi chetonici;

vengono trasformati in fosfolipidi; vengono esterificati in trigliceridi e in minor misura in fosfolipidi ed esteri del colesterolo(Gruffat et al., 1996).Gli acidi grassi non completamente ossidati vengono riesterificati in TAG, legati alle apolipoproteine e rilasciati nel sangue come lipoproteine a bassissima densità (VLDL). Tuttavia, la capacità del fegato di esportare i trigliceridi è limitata(Bobe et al., 2004; J. J. Gross et al., 2013). Quando l'esterificazione degli acidi grassi supera la degradazione dei trigliceridi tramite idrolisi o l'export tramite lipoproteine a bassa densità (VLDL), incorre il fenomeno di lipidosi epatica, costituito dallo stoccaggio dei lipidi in eccesso nel fegato(Bobe et al., 2004; Grummer, 1993).

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

Come conseguenza ci sarà un rigonfiamento, un ingrossamento fisico del fegato e un cambiamento di colore grossolano verso un aspetto giallastro, che indica una notevole infiltrazione di grasso(Josef J. Gross, 2023).

Come fattori di rischio possiamo avere fattori legati all'animale: qualsiasi patologia nell'animale che implichi una diminuzione dell'appetito e del DMI, come chetosi, dislocazione abomasale, mastite e ritenzione di placenta, può portare allo sviluppo di lipidosi; l'alimentazione perché, quando una bovina viene alimentata eccessivamente durante il periodo di asciutta, questa tenderà ad accumulare grasso nel tessuto adiposo. In un animale obeso, gli adipociti hanno una dimensione maggiore e secernono la leptina, una sostanza ad attività ormonale, che porta a diminuire il DMI dell'animale e la sensibilità all'insulina, favorendo l'insorgenza della lipidosi epatica (Bobe et al., 2004).

### **1.4.3 SARA**

La pratica generale nei moderni sistemi di gestione intensiva consiste nel nutrire i ruminanti con quantità massicce di diete ad alto contenuto di concentrato(HC)(Elmhadi et al., 2022).

L'acidosi ruminale subacuta (SARA) è una delle malattie metaboliche più cruciali in vacche alimentate in modo intensivo (Jimmy L. Howard, 1981). Il consumo di una dieta ad alto contenuto di concentrati (HC) aumenta la fermentazione ruminale che produce acidi grassi a catena corta (SCFA), causando una diminuzione del pH ruminale a un livello inferiore a 5,6. La riduzione del pH ruminale stimola la produzione di acidi grassi a catena corta. La riduzione del pH ruminale stimola i batteri Gram-negativi a morire e a rilasciare lipopolisaccaridi (LPS). Quando un animale non riesce a gestire l'equilibrio degli acidi organici, si verifica la SARA (Thomas H. Herdt, 2000).

L'attuale definizione di SARA è una riduzione del pH ruminale da 5,5 a 5,0 per 111-180 minuti nelle 24 ore (Jaramillo-López et al., 2017). Il SARA è uno stato di temporanea perturbazione dei modelli di fermentazione emendativa del rumine; tuttavia, l'intensità e la durata non sono sufficienti a causare segni clinici immediati (Jaramillo-López et al., 2017).

La SARA è nota anche come acidosi subclinica del rumine o acidosi cronica. L'acidosi lattica è una rara patologia accidentale in cui l'ecosistema ruminale è completamente disturbato (Elmhadi et al., 2022). La SARA è un problema predominante per la salute e la produzione dei ruminanti che infligge elevate perdite economiche alle mandrie da latte, riducendo l'assunzione di sostanza secca, la produzione di latte e la redditività, aumentando la perdita di animali a causa dell'abbattimento o della morte (Gozho et al., 2007). La SARA è correlata a problemi deleteri per la salute degli animali, come il danno all'epitelio della mucosa ruminale e la riduzione della degradazione della fibra. Compaiono sintomi come diarrea, cattive condizioni corporee, perdita di peso e riduzione dell'assunzione di sostanza secca e della produzione di latte (Plaizier et al., 2008). Le potenziali conseguenze del SARA che possono verificarsi sono ruminite, depressione del grasso del latte (MFD), laminite e ascessi epatici (Plaizier et al., 2008) illustrate in fig. 3.

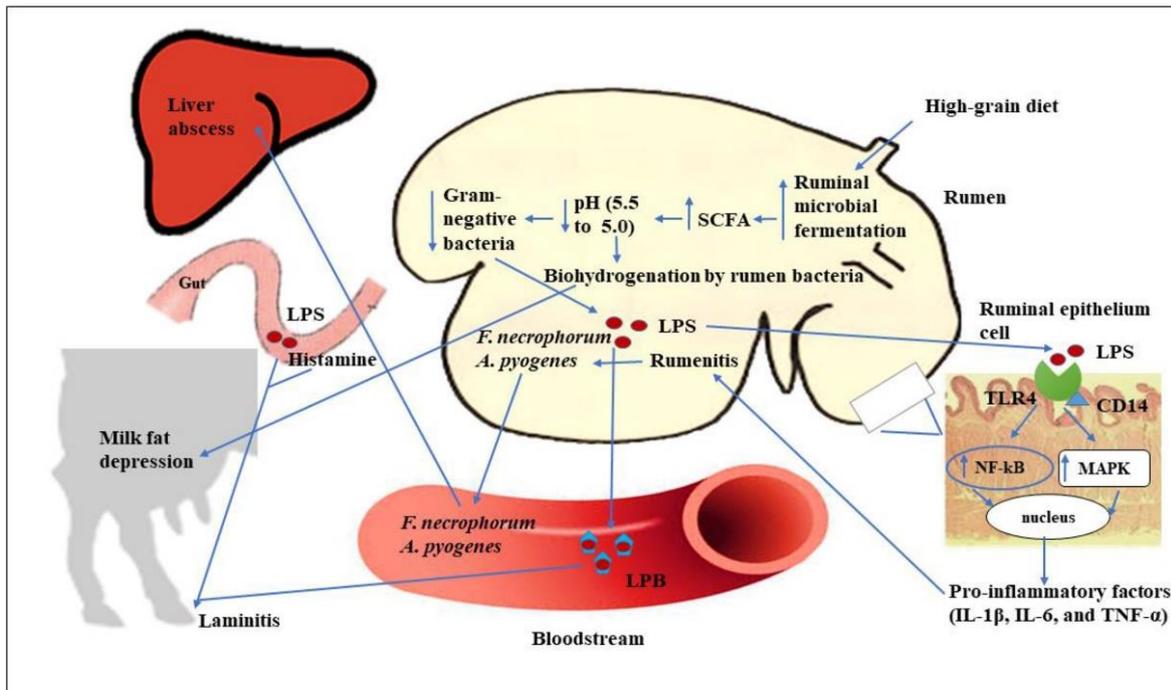


Fig.3 La relazione tra i cambiamenti del microbiota ruminale associati all'acidosi ruminale subacuta e altri disturbi digestivi. La riduzione del pH ruminale dovuta a un'alimentazione ad alto contenuto di cereali altera la bioidrogenazione da parte dei batteri ruminali, con conseguente depressione del grasso del latte. Inoltre, la riduzione del pH ruminale stimola la ruminite(Plaizier et al., 2008).

Il pH del rumine si abbassa quando gli acidi organici, come gli acidi grassi volatili (VFA) e l'acido lattico, si accumulano nel rumine e se il tamponamento del rumine non riesce a tenere il passo con l'accumulo di questi acidi(Plaizier et al., 2008). Somministrare più cereali e meno foraggi aumenterà la produzione di VFA nel rumine, poiché i cereali sono generalmente più digeribili nel rumine rispetto ai foraggi(Plaizier et al., 2008). Nelle vacche sane, i batteri ruminali fermentano l'amido in VFA, glucosio e acido lattico. In seguito, i VFA e l'acido lattico vengono immediatamente assorbiti dalle papille della parete ruminale ed entrano nei vasi sanguigni, dove possono essere utilizzati per la produzione di latte. Tuttavia, in condizioni di acidità, VFA e acido lattico si accumulano nel rumine e contribuiscono all'acidosi(Elmhadi et al., 2022). Inoltre, il rapido rilascio di glucosio nel rumine ha conseguenze negative successive: la crescita di batteri che digeriscono l'amido, come lo *Streptococcus bovis*, aumenta la produzione di lattato, la rapida crescita con un'ulteriore dominanza di batteri Gram-positivi e l'uccisione per defaunazione di batteri Gram-negativi

portano al rilascio di endotossine come l'LPS (lipopolisaccaride) e l'osmolalità del ruminante e l'accumulo di VFA e acido lattico aumentano(Elmhadi et al., 2022).

La SARA riveste una grande importanza economica per le industrie lattiero-casearie. Le perdite finanziarie causate dalla SARA derivano dalla diminuzione della produzione di latte, dalla minore efficienza della produzione di latte, dall'abbattimento prematuro e dall'aumento della mortalità(Enemark, 2008).

#### **1.4.4 Disturbi della fertilità**

L'equilibrio energetico negativo nelle vacche da latte post-partum è caratterizzato da un aumento della modellazione del tessuto adiposo, insulino-resistenza e infiammazione sistemica. Tuttavia, la metà delle vacche postpartum non riesce a adattarsi a questi cambiamenti e sviluppa uno o più tipi di malattie cliniche e subcliniche entro cinque settimane dal parto, accompagnate da un'alterazione della performance riproduttiva nella stessa lattazione. Il disadattamento al periodo di transizione esercita cambiamenti molecolari e strutturali nei fluidi follicolari e del tratto riproduttivo, il microambiente in cui avvengono la maturazione degli ovociti, la fecondazione e lo sviluppo dell'embrione(Pascottini et al., 2022).

Dopo il parto, il rivestimento dell'utero viene espulso e deve essere rigenerato, mentre sostanzialmente tutte le vacche da latte subiscono una contaminazione batterica dell'utero nelle prime 2-3 settimane dopo il parto(Sheldon et al., 2008). Pertanto, l'infiammazione è una componente necessaria dell'involuzione uterina. Tuttavia, i batteri patogeni possono superare le difese immunitarie innate (risposta insufficiente), oppure la gravità o la durata dell'infiammazione possono compromettere anziché migliorare la fertilità(Pascottini et al., 2022).

I neutrofili sono essenziali per il processo infiammatorio e la difesa dell'ospite, in quanto migrano rapidamente verso il sito della lesione o dell'infezione. Durante l'infezione, queste cellule infiammatorie fagocitano e uccidono i microrganismi attraverso diversi meccanismi che includono il rilascio di specie reattive dell'ossigeno, proteasi e la formazione di trappole extracellulari neutrofile (NET). A differenza dei macrofagi e delle cellule dendritiche, questi fagociti hanno vita breve e vanno incontro a morte cellulare entro poche ore o giorni

dall'attivazione (Paape et al., 2002). Tuttavia, i neutrofili disfunzionali possono persistere nel lume uterino fino al momento della riproduzione (Pascottini et al., 2022), creando un ambiente non ottimale per il trasporto degli spermatozoi e lo sviluppo embrionale precoce (Figura 4).

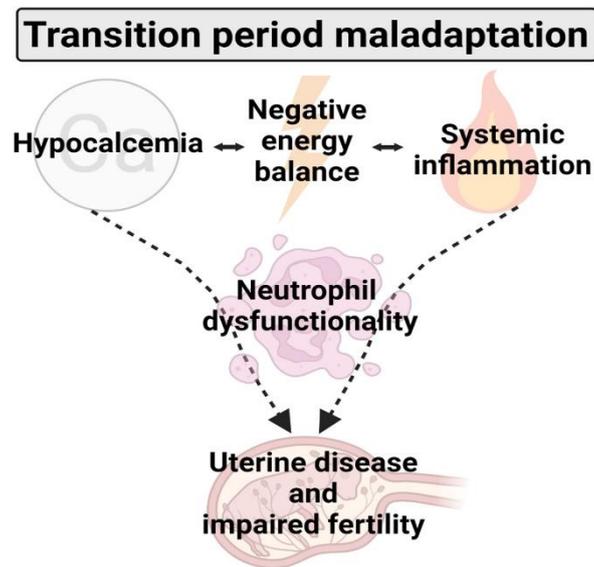


Fig. 4: Illustrazione schematica degli effetti del disadattamento del periodo di transizione sulla funzionalità dei neutrofili. L'ipocalcemia, l'esacerbazione del bilancio energetico negativo e l'eccessiva infiammazione sistemica indeboliscono la capacità di uccisione dei neutrofili. I neutrofili disfunzionali non sono in grado di sostenere la lotta contro gli agenti patogeni uterini invasori (metrite ed endometrite clinica) o possono persistere nel lume uterino fino al momento della riproduzione (endometrite subclinica). Entrambe le condizioni creano un ambiente non ottimale per il trasporto degli spermatozoi e lo sviluppo embrionale precoce, compromettendo la fertilità (Pascottini et al., 2022).

Il disadattamento alla NEB può influire sulla salute dell'utero in due modi diversi, indirettamente attraverso la disfunzione del sistema immunitario innato e direttamente attraverso la lipotossicità. L'ipoglicemia, i NEFA elevati e l'iperchetonemia nel primo postpartum sono fattori di rischio per le malattie uterine (Dubuc et al., 2010; Pascottini et al., 2022). Il principale carburante per la funzione dei neutrofili è il glucosio e l'immunoattivazione sembra essere un processo fisiologico dominante per il reindirizzamento del glucosio indipendente dall'insulina (Kvidera et al., 2017). Nonostante lo

stato di insulino-resistenza dei tessuti periferici per sostenere la lattogenesi, la diminuzione della produzione di latte è tra i primi segni di infezione nelle bovine da latte. I neutrofili sembrano essere consumatori obbligati di glucosio e la riduzione della sintesi del latte è una strategia per risparmiare glucosio per sostenere la funzione dei neutrofili (LeBlanc, 2020). La produzione di ATP (Adenosina trifosfato) mitocondriale è importante per l'attivazione iniziale dei neutrofili, ma i neutrofili passano poi alla glicolisi come fonte principale di ATP per sostenere un afflusso di calcio adeguato a mantenere il burst ossidativo e la degranolazione (Pascottini et al., 2022). Inoltre, la produzione di NET dipende dall'assorbimento di glucosio da parte di GLUT1 (l'assorbimento cellulare di glucosio nei neutrofili è facilitato dal trasportatore di glucosio non insulino-dipendente), la cui espressione è aumentata dopo l'attivazione dei neutrofili (Pascottini et al., 2022). In realtà, l'energia necessaria per la formazione dei NET deriva prevalentemente dalla glicolisi. NEFA sierici  $>0,6$  mmol/L nella settimana prima del parto sono associati a un aumento del rischio di placenta ritenuta e metrite e NEFA elevati ( $>1,0$  mmol/L) e BHB ( $>1,1$  mmol/L) nel primo periodo postpartum sono fattori di rischio per l'endometrite subclinica 3-4 settimane dopo (Dubuc et al., 2010; Seifi et al., 2011). Diversi studi hanno anche riportato che i NEFA alterano il burst ossidativo, l'apoptosi e la necrosi di neutrofili e macrofagi in vitro, che possono essere responsabili del danno alle cellule ospiti e della morte per necrosi durante l'inizio della lattazione (Pascottini et al., 2022). Quando l'involuzione uterina è incompleta, sia i prodotti batterici residui, sia i mediatori infiammatori endogeni, possono compromettere lo sviluppo dell'embrione e interrompere la gravidanza. La secrezione endometriale e il trasporto di molecole nel lume uterino sono processi delicati, spazialmente e temporalmente programmati (Pascottini et al., 2022). Lo sviluppo embrionale pre-impianto richiede una regolazione ottimale del metabolismo cellulare. Un'alterata disponibilità di nutrienti può compromettere l'omeostasi metabolica con conseguente arresto dello sviluppo embrionale o mortalità embrionale precoce (Leese et al., 2008). È stato dimostrato che elevate concentrazioni di NEFA disturbano il metabolismo e la funzione di barriera dell'epitelio oviduttale, compromettendo potenzialmente lo sviluppo degli zigoti (Jordaens et al., 2017).

All'inizio della lattazione si verificano importanti cambiamenti ormonali, metabolici e infiammatori. Questi cambiamenti coincidono con la finestra di sensibilità degli ovociti e dei

follicoli durante lo sviluppo. Pertanto, il disadattamento al periodo di transizione può influire significativamente sulla qualità degli ovociti e sulla funzione delle cellule della granulosa, con un impatto negativo sulle prestazioni riproduttive al momento della riproduzione (Pascottini et al., 2022).

Un'inflammation uterina eccessiva o cronica nel periodo post-partum è associata a un'alterazione dello sviluppo follicolare. Le vacche che sviluppano metrite entro 21 giorni dal parto hanno meno probabilità di ovulare il primo follicolo dominante (Pascottini et al., 2022). La chetosi nelle vacche da latte è indicativa di una possibile alterazione dei processi infiammatori che può riflettersi in cambiamenti nella composizione dei fluidi follicolari e del tratto riproduttivo, il microambiente in cui avvengono la maturazione degli ovociti, la fecondazione e lo sviluppo dell'embrione (Pascottini et al., 2022).

#### **1.4.5 Immunosoppressione**

La definizione letterale di immunosoppressione è quella di diminuzione della reattività immunitaria. L'immunità contro le malattie infettive è mediata da meccanismi cellulari e umorali diversi e spesso interdipendenti. La soppressione immunitaria può verificarsi come conseguenza di diversi fattori:

- condizioni fisiologiche naturali (ad esempio, gravidanza, parto e immaturità neonatale);
- episodi di malattie infettive primarie che possono predisporre i bovini a eventi patologici secondari;
- esposizione a vari tipi di stress (sia naturali che indotti dalla gestione) e a fattori ambientali (deficit nutrizionali, tossicità, stress da trasporto/spedizione, commistione) (Kehrli et al., 2009).

La transizione dalla tarda gestazione all'inizio della lattazione comporta drastici cambiamenti fisiologici, tra cui cambiamenti metabolici e immunosoppressione nella vacca da latte. Il glucosio è il carburante preferito dalle cellule immunitarie e la sua bassa concentrazione durante il periodo di transizione può spiegare in parte l'utilizzo da parte delle cellule immunitarie e in primo luogo è stato dimostrato che inibisce la risposta immunitaria

quando la concentrazione è relativamente alta. il tipo di acido grasso può stimolare (ad esempio, gli acidi grassi saturi) o inibire (ad esempio, gli acidi grassi insaturi) la risposta immunitaria(Klaus L. Ingvarlsen and Moyes, 2015b). Una regolazione non adeguatamente coordinata e quindi l'adattamento a stati fisiologici modificati porteranno alla PI (physiological imbalance), una situazione in cui i meccanismi omeorici e omeostatici sono insufficienti per il funzionamento ottimale dell'animale(Klaus L. Ingvarlsen and Moyes, 2015b). La PI nelle vacche è stata definita come vacche i cui parametri si discostano dalla norma e che di conseguenza hanno un rischio maggiore di sviluppare malattie della produzione (cliniche o subcliniche) e di ridurre la produzione e/o la riproduzione. Un esempio importante di PI è l'eccessiva mobilitazione. In caso di eccessiva mobilitazione, i tassi di lipogenesi sono molto bassi, mentre la lipolisi è molto alta, con conseguenti elevate concentrazioni plasmatiche di acidi grassi non esterificati (NEFA) e glicerolo(K. L. Ingvarlsen and Moyes, 2013). L'aumento dei NEFA è correlato a un ridotto apporto di sostanza secca e di conseguenza a una bassa concentrazione plasmatica di glucosio e a un aumento della chetogenesi e quindi dei livelli di corpi chetonici (K. L. Ingvarlsen, 2006).

L'immunosoppressione naturale si verifica nella maggior parte delle vacche durante la tarda gravidanza e l'inizio della lattazione. Le cellule immunitarie coinvolte nella risposta immunitaria innata e adattativa sono alterate durante il periodo di transizione. La funzione dei neutrofili, che fanno parte della prima linea di difesa contro i microrganismi invasori, è in questo periodo è ridotta, compresa la chemiotassi, cioè la migrazione verso il sito di infezione, la fagocitosi, cioè l'ingestione del microrganismo invasore, e l'esplosione ossidativa, cioè l'uccisione del microrganismo invasore durante la fagocitosi(Klaus L. Ingvarlsen and Moyes, 2015b). Inoltre, il numero e la proliferazione dei linfociti si riducono durante il periodo di transizione(Kehrli et al., 2009). Il cambiamento dell'ambiente ormonale, in particolare l'aumento dei glucocorticoidi circolanti al momento del parto, è stato associato all'immunosoppressione naturale osservata in questo periodo(Klaus L. Ingvarlsen and Moyes, 2015a). A causa dell'immunosoppressione naturale intorno al parto, questo periodo è considerato un periodo ad alto rischio per lo sviluppo di mastite. La mastite è definita come un'infiammazione della ghiandola mammaria di solito come conseguenza di un'invasione patogena. Nelle vacche sane, le cellule somatiche del latte (cioè, le cellule

immunitarie) comprendono principalmente macrofagi e linfociti residenti (Klaus L. Ingvarstsen and Moyes, 2015a). Durante la mastite, la popolazione di cellule somatiche si sposta verso un'ampia percentuale di neutrofili ( $\sim 90\%$ ). I neutrofili sono la principale cellula immunitaria responsabile dell'uccisione microrganismi invasori durante la mastite (Green et al., 2002).

Essendo molti i fattori che possono condizionare positivamente o negativamente l'efficienza del sistema immunitario, sia umorale che cellulo-mediato, è bene mettere a punto tecniche di gestione zootecnica e sanitaria in grado di esaltare l'efficienza dell'immunità della vacca da latte. In primis gioca un ruolo primario la rimozione dello stress dotando gli animali del giusto spazio nel close-up per mangiare, bere e riposare, evitando pericolosi conflitti sociali. L'alimentazione energetica e proteica d'asciutta deve essere finalizzata a mantenere elevato il livello d'ingestione. Particolare attenzione deve essere posta all'alimentazione macrominerales perché causa delle pericolose ipocalcemie post-partum, anch'esse legate direttamente ai sistemi difensivi sia dell'utero che della mammella ed indirettamente alla chetosi.

## 2 CHETOSI

---

La chetosi è attualmente considerata un importante disturbo metabolico delle vacche da latte, che riflette gli sforzi dell'animale di adattarsi al deficit energetico durante la transizione verso la lattazione. Attualmente considerata come una patologia da alcuni, la chetosi è associata a perdite di produzione di latte e a complicazioni di salute peripartale che aumentano il rischio di rimozione precoce delle vacche dalla mandria, con conseguenti perdite economiche per gli allevatori e compromettendo la sostenibilità dell'industria lattiero-casearia(Rico and Barrientos-Blanco, 2024).

### 2.1 METABOLISMO DEI CORPI CHETONICI

I corpi chetonici, acetoacetato (AcAc), D- $\beta$ -idrossibutirrato (BHB) e acetone, sono substrati energetici sintetizzati principalmente nei mitocondri epatici e ruminanti che servono come combustibili metabolici per la respirazione cellulare nei tessuti extraepatici(Rico and Barrientos-Blanco, 2024). Sebbene i chetoni possano essere sintetizzati dagli aminoacidi, gli acidi grassi (FA) costituiscono di gran lunga la principale fonte di chetoni nella maggior parte delle situazioni metaboliche(Puchalska and Crawford, 2017).

I chetoni sono uno di questi substrati che sembrano essere un carburante metabolico vitale in tutti i domini della vita(Puchalska and Crawford, 2017) e che possono sostenere il metabolismo cellulare in diversi tessuti corporei quando la disponibilità di glucosio è ridotta. Da questo punto di vista, la produzione di chetoni rappresenta un adattamento versatile del metabolismo alla disponibilità di nutrienti (glucosio, aminoacidi, acidi grassi) e una testimonianza della flessibilità metabolica della fisiologia dei mammiferi. Gli stati chetogenici sono quindi una caratteristica del normale metabolismo adattativo in tutto lo spettro dei mammiferi(Rico and Barrientos-Blanco, 2024).

La chetogenesi è il processo di trasformazione degli acidi grassi in AcAc e BHB. Questo processo ha luogo nei mitocondri degli epatociti. La produzione di acidi grassi nel tessuto adiposo è stimolata dall'epinefrina e dal glucagone e inibita dall'insulina(Laffel, 1999). L'acetil CoA è il collegamento al ciclo dell'acido citrico dopo la glicolisi del glucosio o la  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi. Per entrare nel ciclo dell'acido citrico, l'acetil CoA si condensa

prima con l'ossalacetato (Figura 5). L'ossalacetato deriva dal piruvato durante la glicolisi. Pertanto, è essenziale avere un livello di glicolisi che fornisca una quantità di ossalacetato sufficiente a condensare con l'acetil CoA (Laffel, 1999). Se i livelli di glucosio diventano troppo bassi (ad esempio durante il digiuno o i bassi livelli di insulina nel diabete), l'ossalacetato viene utilizzato preferenzialmente nel processo di gluconeogenesi, invece di condensarsi con l'acetil CoA. L'acetil CoA viene quindi dirottato verso la formazione di corpi chetonici (Laffel, 1999).

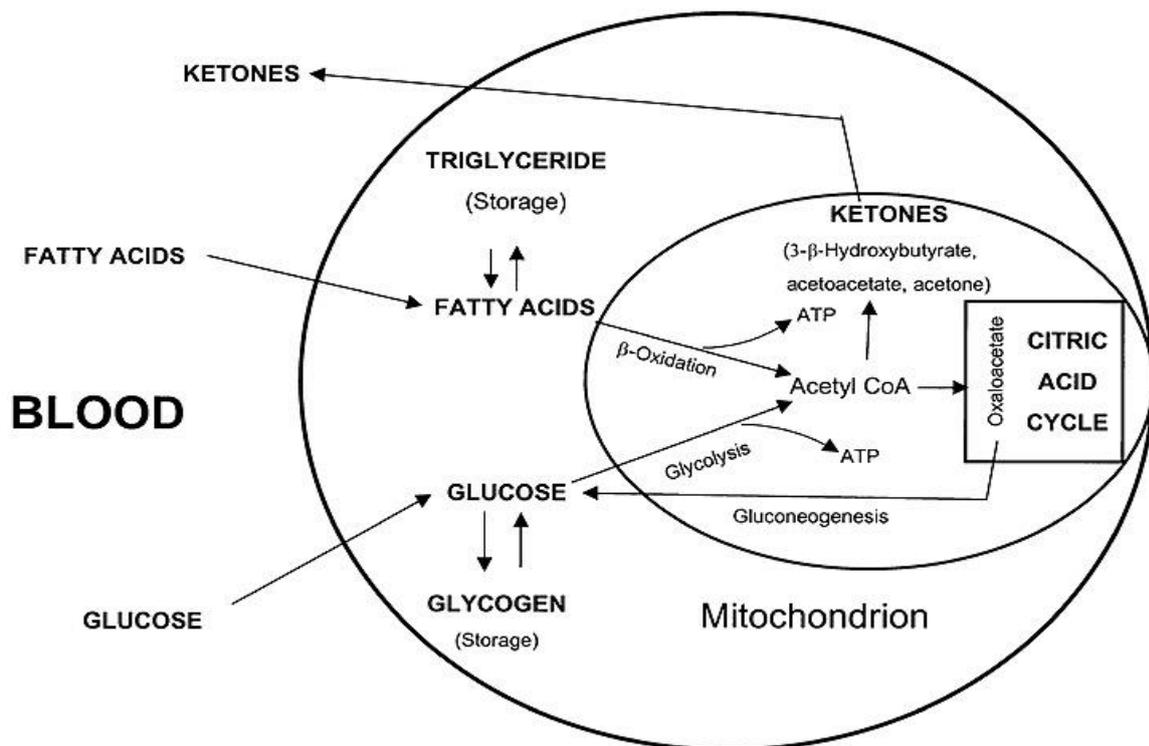


Figura 5: Relazione tra il metabolismo del glucosio e degli acidi grassi e la formazione di corpi chetonici nell'epatocita. Il glucosio e gli acidi grassi vengono metabolizzati in acetil CoA, che entra nel ciclo dell'acido citrico condensandosi con l'ossalacetato. La glicolisi produce piruvato, che è un precursore dell'ossalacetato. Se la glicolisi scende a livelli molto bassi, l'ossalacetato viene utilizzato preferenzialmente nel processo di gluconeogenesi. In questo caso l'ossalacetato non è disponibile per condensarsi con l'acetil CoA prodotto dal metabolismo degli acidi grassi e l'acetil CoA viene dirottato dal ciclo dell'acido citrico alla formazione dei corpi chetonici (Laffel, 1999).

Sebbene la chetogenesi produca i 3 diversi corpi chetonici, in genere solo il D-BHB e l'AcAc sono prontamente disponibili in quantità significative per l'uso metabolico, soprattutto a causa della perdita dell'acetone, altamente volatile, attraverso le vie respiratorie. Dei due chetoni rimanenti, il BHB rappresenta la forma di gran lunga predominante disponibile per

l'uso metabolico. Sebbene i tassi di chetogenesi dipendano in larga misura dal flusso di substrati ossidabili che raggiungono il fegato (cioè FA e aminoacidi), il tasso di formazione dei chetoni è regolato ormonalmente per soddisfare le esigenze durante specifici stati fisiologici (Rico and Barrientos-Blanco, 2024). Durante gli stati di insufficienza energetica, come il primo postpartum, la secrezione di insulina e l'azione dell'insulina sono ridotte, mentre la secrezione e l'azione del glucagone sono aumentate (De Boer et al., 1985). Questa disposizione dei segnali ormonali, in cui prevale l'azione del glucagone, promuove la chetogenesi indirettamente stimolando la lipolisi (attraverso la stimolazione della lipasi sensibile all'ormone) e l'inibizione della lipogenesi (cioè l'inattivazione dell'acetil CoA carbossilasi; ACC), nonché favorendo la  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi (attraverso la limitata capacità dell'ACC di ostacolare il trasporto di FA per l'ossidazione mitocondriale) (Laffel, 1999).

## **2.2 EZIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA**

La chetosi è un problema importante nelle vacche ad alta produzione, che raggiunge facilmente una prevalenza del 20% durante il primo postpartum, quando il bilancio energetico negativo è ben consolidato (Lei and Simões, 2021). La chetosi è un disturbo metabolico comune nelle vacche da latte che si verifica 2-4 settimane dopo il parto (Tufarelli et al., 2024), quando l'appetito è depresso e l'apporto energetico della dieta non riesce a soddisfare le crescenti richieste metaboliche per la produzione di latte. La chetosi si riferisce a concentrazioni elevate di corpi chetonici (acetoacetato,  $\beta$ -idrossibutirrato e acetone) nel sangue a causa dell'eccessiva ossidazione degli acidi grassi ad acetil-CoA rispetto all'ossidazione dell'acetil-CoA a CO<sub>2</sub> e acqua nei mitocondri (Wu, 2020). Le elevate concentrazioni di corpi chetonici spesso comportano perdite produttive e riproduttive e persino la morte o l'abbattimento precoce (Lei and Simões, 2021). I chetoni sono sottoprodotti della conversione dei grassi in carboidrati e i ruminanti li utilizzano come fonte di energia in misura limitata in condizioni fisiologiche. È fondamentale ridurre la gravità e la durata della NEB per prevenire la chetosi (García et al., 2011).

Questo periodo di bilancio energetico negativo interessa tutte le vacche perché mobilitano le loro riserve di grasso per soddisfare il fabbisogno energetico del cervello, delle ghiandole

mammarie in lattazione, dei muscoli e di altri tessuti. I fattori che riducono l'assunzione di mangime e compromettono la gluconeogenesi aumentano il rischio di chetosi(Wu, 2020). Tra i fattori favorevoli alla predisposizione metabolica delle vacche alla chetosi vi è la costituzione del latte, mentre gli errori immediati nell'alimentazione e la mancata regolazione neuro-ormonale del metabolismo contribuiscono al problema(Tufarelli et al., 2024). Le vacche sono fisiologicamente predisposte a una carenza di carboidrati, in particolare di glucosio, rendendo il processo di gluconeogenesi da altre fonti (acido propionico, glicerolo e proteine) cruciale per il mantenimento dell'equilibrio metabolico. Un eccesso di concentrati nella dieta altera l'equilibrio fisiologico degli acidi grassi volatili nel rumine, favorendo gli acidi chetogenici (acido acetico e butirrico) a scapito dell'acido propionico. All'inizio della lattazione, le vacche devono far fronte a un improvviso e drastico aumento del fabbisogno energetico(Tufarelli et al., 2024). L'aumento dell'assunzione di cibo dopo il parto è in ritardo rispetto al fabbisogno energetico durante l'allattamento, portando a una NEB(Mekuriaw, 2023). I grassi vengono mobilitati dalle riserve corporee sotto forma di NEFA per soddisfare il fabbisogno energetico. I NEFA arrivano al fegato dove vengono utilizzati in tre modi: ossidazione completa in energia, ossidazione incompleta in corpi chetonici o riesterificazione in acidi grassi(Cotter et al., 2014). All'inizio della lattazione, l'omeoresi è uno dei principali processi fisiologici. A causa della mancanza di acido ossalacetico (ossalacetato), si verifica una maggiore degradazione dei grassi nel fegato, con conseguente abbondante formazione di chetoni(Bradford and Swartz, 2020). I chetoni si accumulano nel sangue (chetonemia) e nei tessuti e vengono escreti nelle urine (chetonuria)(Fukao et al., 2014). Il fegato è in grado di compensare i cambiamenti metabolici che si verificano e lo scompenso inizia quando le riserve di glicogeno e di biocatalizzatori si esauriscono, portando alla degenerazione grassa epatica e successivamente alla cirrosi. Tra i sottoprodotti chetonici, l'acido acetoacetico è il più importante e svolge un ruolo cruciale nell'intossicazione dell'organismo. A causa dell'accumulo di altri prodotti di degradazione acida, si verificano alterazioni delle sostanze, con conseguente acidosi metabolica e disidratazione, che complicano ulteriormente le già disturbate condizioni generali dell'animale(Tufarelli et al., 2024).

Il primo schema di classificazione classifica la chetosi in tre tipi generali, tra cui la chetosi di tipo I, la chetosi di tipo II e la chetosi da insilati di acido butirrico ( di tipo III), in base all'eziologia e al momento in cui si verifica l'iperchetonemia(G. Zhang and Ametaj, 2020).

La chetosi di tipo 1, o chetosi primaria, è una chetosi spontanea che si verifica nelle vacche denutrite ed è nota anche come sindrome della vacca magra. Si manifesta tipicamente nelle vacche da 2 a 4 settimane dopo il parto(Wu, 2020). Denominata tipo 1 per la sua somiglianza con il diabete mellito di tipo 1, entrambe le condizioni presentano una riduzione della concentrazione di insulina nel sangue, sebbene le cause siano diverse. Nel diabete, la concentrazione di insulina diminuisce a causa di disturbi della secrezione ormonale pancreatica, mentre nella chetosi è bassa a causa dell'ipoglicemia cronica(Service F.J., 1995), dovuta alla carenza di precursori del glucosio per la produzione di latte. In questo caso, i precursori del glucosio vengono assorbiti dalla dieta (soprattutto propionato) o dalle proteine muscolari sotto forma di aminoacidi (AA, cioè gluconeogenesi). Tuttavia, la capacità del processo gluconeogenico è limitata a causa della protezione dell'ospite da parte delle proteine muscolari. D'altra parte, la lipolisi e la chetogenesi sono potenziate e gli acidi grassi e i corpi chetonici vengono utilizzati per risparmiare glucosio e soddisfare il fabbisogno energetico(G. Zhang and Ametaj, 2020).

La chetosi di tipo 2, o chetosi secondaria, nota anche come sindrome della vacca grassa, comprende le vacche obese e quelle che sperimentano la NEB e la mobilitazione del grasso poco prima del parto. Il cambiamento fondamentale nella chetosi di tipo 2 è la degenerazione grassa del fegato, clinicamente evidente dopo il parto. Le vacche obese sono le più a rischio perché sono soggette a una riduzione dell'assunzione di cibo durante il parto (John R. Roche et al., 2013).L'eccessiva lipolisi si manifesta con un aumento significativo delle concentrazioni di NEFA e un accumulo più massiccio di trigliceridi nel fegato. Durante la gluconeogenesi intensiva, grandi quantità di NEFA dal siero vengono reindirizzate al fegato, dove vengono sintetizzate in corpi chetonici. I corpi chetonici sono costituiti dal 70% di BHB, dal 28% di acetoacetato e dal 2% di acetone(Guliński, 2021). Il corpo chetonico predominante dipende dalla fase della lattazione. I fegati grassi degenerati hanno un potenziale gluconeogenico ridotto e i segni della malattia nelle vacche compaiono prima o entro le prime settimane dal parto. La chetosi di tipo 2 è metabolicamente simile al diabete

di tipo 2: entrambe le condizioni presentano concentrazioni elevate di insulina e glucosio nel sangue (in modo transitorio nelle vacche con chetosi), interpretate come insulino-resistenza tissutale(Tufarelli et al., 2024). L'obesità sembra svolgere un ruolo significativo nella resistenza all'insulina dei tessuti. Nelle vacche obese, la mobilitazione del grasso peggiora la degenerazione grassa epatica esistente, promuove la formazione di chetoni e riduce l'appetito(Wu, 2020). La concentrazione di chetoni è elevata, ma è comunque inferiore a quella della chetosi di tipo 1. Gli epatociti grassi degenerati hanno un potenziale gluconeogenico ridotto e la risposta immunitaria del fegato è compromessa (Mooli and Ramakrishnan, 2022).

La chetosi legata al consumo di insilati arricchiti di acido butirrico è il terzo tipo di chetosi secondo lo schema di categorizzazione. Questo tipo di chetosi è stato attribuito all'assunzione di mangimi ad alto contenuto di precursori chetogenici (cioè, di acido butirrico)(G. Zhang and Ametaj, 2020). Le ragioni dell'accumulo di acido butirrico nell'insilato sono legate, ad esempio, alla preparazione dell'insilato con fieno che contiene pochi carboidrati idrosolubili o all'insilato tritato troppo umido, che favorisce la crescita di batteri di Clostridium sp. A causa di essi i carboidrati vengono metabolizzati in acido butirrico anziché in acido lattico(G. Zhang and Ametaj, 2020). Le vacche utilizzano principalmente l'acido butirrico come fonte di energia per il muscolo del ruminante. Circa il 75% dell'acido butirrico rimanente viene convertito in BHB, una delle cause dirette della chetosi. Il fegato può trasformare il BHB prodotto in acido acetoacetico o invertire il processo. La dose giornaliera di acido butirrico per le bovine da latte dovrebbe essere inferiore a 50 g per vacca(Tufarelli et al., 2024). Tuttavia, il fatto che una vacca sviluppi o meno la chetosi da insilati dipende anche dalla quantità di insilati consumati e dalla presenza di altri fattori di rischio (ad esempio, lattazione precoce, acidosi ruminale, elevata produzione di latte, bassa energia alimentare ed elevate proteine alimentari) per la chetosi(G. Zhang and Ametaj, 2020). L'aerazione dell'insilato prima della somministrazione alle vacche può ridurre il contenuto di acido butirrico del 50%, rendendolo più adatto alla somministrazione(Tufarelli et al., 2024).

### 2.3 PRESENTAZIONE CLINICA

La seconda categorizzazione per classificare la chetosi si basa sulle concentrazioni di  $\beta$ OHB nel sangue e sulla mancanza o presenza di segni clinici di malattia. Di conseguenza, la chetosi viene classificata in due forme: la chetosi subclinica e la chetosi clinica (G. Zhang and Ametaj, 2020). La chetosi subclinica nelle vacche da latte è la presenza di corpi chetonici in circolo senza la presenza di segni clinici di chetosi. La chetosi subclinica (fase latente) si manifesta con disturbi generali non specifici dell'equilibrio metabolico (Tufarelli et al., 2024). Essa si verifica in presenza di valori di BHB nel sangue (siero) compresi tra 1,2 mmol e 1,4 mmol, a causa del fabbisogno energetico per la produzione di latte (Lei and Simões, 2021). Comprende una produzione di latte squilibrata, una tendenza a perdere peso nonostante l'appetito e la normale funzione del ruminante, e occasionalmente una moderata chetonuria. Una vacca con chetosi subclinica sviluppata può non essere sempre magra (ad esempio, nel caso della sindrome della vacca grassa) (Tufarelli et al., 2024). La produzione di latte squilibrata è caratterizzata da significative variazioni giornaliere della quantità di latte senza una causa visibile (Schmitz et al., 2021). Dal punto di vista biochimico, la chetosi subclinica è caratterizzata da ipoglicemia e chetonemia. La chetosi subclinica rimane latente finché l'aumento della concentrazione di chetoni non supera la concentrazione di glucosio nel sangue. A causa del suo decorso latente e delle significative perdite di produzione, la chetosi subclinica ha una notevole importanza pratica ed economica (Tufarelli et al., 2024). La prevalenza della chetosi subclinica nelle vacche da latte all'inizio della lattazione varia dal 7,5% al 14%. Le vacche con chetosi subclinica hanno una probabilità 4,9 volte maggiore di sviluppare metrite, 6,1 volte maggiore di sviluppare abomaso dislocato e 1,98 volte maggiore di sviluppare malattie degli zoccoli (Satoła and Bauer, 2021).

La fase clinicamente manifesta si verifica quando la concentrazione di chetoni nel sangue supera la concentrazione di glucosio, ma può anche manifestarsi prima se la regolazione ormonale viene meno (Tufarelli et al., 2024). La chetosi clinica, come suggerisce la denominazione, si applica ai casi di iperchetonemia accompagnati dalla manifestazione di segni clinici e ipoglicemia (Gordon et al., 2013), solitamente evidenti a concentrazioni di BHB nel sangue  $\geq 3,0$  mmol/L (Lei and Simões, 2021). Non è detto però che a concentrazioni

elevate di BHB corrisponda un impoverimento dello stato di salute dell'animale; alcuni animali mostrano segni clinici per lievi aumenti della concentrazione plasmatica di BHB, tuttavia sono documentati anche casi senza segni clinici associati a concentrazioni di BHB superiori a 3,0 mmol/L (Oetzel, 2004). Inizialmente, nella presentazione clinica predominano i sintomi generali dell'alterazione del bilancio energetico e della sindrome da indigestione. Di conseguenza, si assiste a una rapida perdita di peso all'inizio della lattazione, a una ridotta produzione di latte, a una diminuzione della fertilità, a un aumento dei costi dei servizi veterinari e, infine, a un maggior numero di vacche abbattute. La temperatura corporea può essere normale, ma anche ridotta, soprattutto a causa della diminuzione dei processi ossidativi nell'organismo. Possono verificarsi bradicardia e bradipnea(Tufarelli et al., 2024). La maggior parte degli animali è letargica, ha un appetito ridotto o variabile e può presentare un comportamento anomalo. La funzione del rumine è disturbata, con conseguente acidosi o ostruzione(Cascone et al., 2022). Questi sintomi derivano da un aumento della concentrazione di chetoni nel sangue, nel contenuto del rumine e nelle urine(Tufarelli et al., 2024). La concentrazione totale di chetoni nel sangue può aumentare da 5 a 10 volte rispetto al livello fisiologico, mentre nelle urine può aumentare da 10 a 100 volte(G. Zhang and Ametaj, 2020). Se i corpi chetonici vengono trovati nelle urine al 21° giorno della malattia, e prima di allora sono state adottate misure preventive e procedure di trattamento, la vacca deve essere abbattuta(Guliński, 2021; Tufarelli et al., 2024). Nei casi più gravi e avanzati, la chetosi può essere accompagnata da segni di acidosi metabolica, disidratazione e disturbi del sistema nervoso centrale. L'acidosi si verifica a causa dell'accumulo di sottoprodotti acidi del metabolismo e della riduzione delle riserve alcaline. La perdita di ioni sodio porta alla perdita di acqua dall'organismo(Wu, 2020). La disidratazione si manifesta con emoconcentrazione e relativa iperproteinemia. Il turgore della pelle è ridotto e gli occhi sono infossati. I sintomi del sistema nervoso centrale derivano dalla riduzione dei processi ossidativi nel sistema nervoso (a causa della carenza di carboidrati) e dagli effetti tossici dei sottoprodotti metabolici, in particolare dell'acido acetoacetico. Nei casi acuti, si verificano sintomi specifici di malattie del sistema nervoso, come eccitazione, paresi, parestesia e iperestesia. Gli animali masticano aria vuota, digrignano i denti, muggiscono, hanno uno sguardo selvaggio e la saliva gocciola dalla bocca(Tufarelli et al., 2024). Se si sviluppa la forma

nervosa, la vacca può leccare se stessa o oggetti inanimati in modo persistente, mostrare un comportamento aggressivo irregolare, presentare una postura anomala della testa e persino soffrire di cecità(Lei and Simões, 2021). Nei casi avanzati, gli animali cadono in uno stato di torpore e, infine, in coma. I sintomi provenienti dal fegato sono importanti per la prognosi e l'esito della malattia(Tufarelli et al., 2024). Nei casi più lievi di chetosi, di solito non si riscontrano segni clinici e biochimici di malattia epatica. Nei casi gravi e avanzati, e se il processo è cronico, si può osservare un fegato aumentato e moderatamente sensibile alla percussione e alla palpazione (nell'area dietro l'ultima costola destra)(Krempaský et al., 2014). Le feci degli animali colpiti hanno generalmente una consistenza più secca e il pelo può avere un aspetto opaco, secco ed eretto(Lei and Simões, 2021). Dal punto di vista istologico, si osserva una degenerazione grassa (steatosi) del fegato e, nei casi avanzati, può verificarsi una cirrosi(Tufarelli et al., 2024).

La prevalenza media della chetosi subclinica risulta essere del 24,1%, con un range dall'8,3% al 40,1%(Brunner et al., 2019) mentre quella della chetosi clinica può variare dal 2% al 15%(David Baird, 1982). Senza contare l'eziologia, il 90% dei casi di chetosi avviene nei primi 60 dopo il parto, più frequentemente nel primo mese di lattazione(Constable et al., 2016). I principali fattori di rischio riguardano la bovina e la sua gestione: all'aumentare dell'età e del numero di lattazione il rischio di sviluppo di chetosi aumenta(Constable et al., 2016), con la quarta lattazione che presenta una prevalenza del 22% per la chetosi clinica(Kauppinen, 1983); un elevato BCS preparto diminuisce il DMI, aggrava la condizione di NEB(Hayirli et al., 2002), tale per cui in bovina con BCS al parto maggiore di 3,5 presenta un rapporto di probabilità (odds ratio) di 2,4 per lo sviluppo della chetosi ed inoltre tenderà a perdere una maggiore quantità di peso, rispetto ad una bovina sana(Gillund et al., 2001); il parto in inverno aumenta il rischio di chetosi(Constable et al., 2016), con un odds ratio nei mesi da gennaio a dicembre di 5,6(Gröhn et al., 1989); bovine alimentate con un total mixed ration (TMR) presentano una prevalenza più bassa rispetto a bovine a cui vengono forniti foraggi e concentrati in momenti diversi della giornata(Constable et al., 2016). Altri fattori possono essere: eccessiva lunghezza del periodo di asciutta, bovine ad alta produzione, con elevato volume di colostro alla prima mungitura, presenza di ipocalcemia, ritenzione di placenta, metrite e ipomagnesemia(Constable et al., 2016).

La rottura produttiva e l'assunzione selettiva di cibo sono i segni più frequentemente riscontrati nei bovini con chetosi (Dar et al., 2018)(Tabella 1).

Tab. 1 Frequenza relativa dei diversi segni clinici che possono essere manifestati da una vacca con chetosi(Dar et al., 2018).

<b>Clinical Sign</b>	<b>Number of Animals that Showed the Sign</b>	<b>Percentage from the Affected Animals (%)</b>
Nervous signs	1	4
Reluctance to movement	1	4
Constipation	4	14
Acetone odor on breath or milk	5	18
Dry and fewer feces	6	21
Complete anorexia	7	25
Prostration	10	36
Selective food intake	21	75
Abrupt drop in productivity	28	100

Tuttavia, tutti questi segni sono aspecifici e alcuni sono spesso poco evidenti e quindi difficili da rilevare, aumentando così il rischio di ottenere una diagnosi errata e la difficoltà di distinguere correttamente la chetosi clinica da quella subclinica.

Parametri come la temperatura, il polso e l'andamento della respirazione si discostano dalla norma solo in presenza di altre condizioni nosologiche concomitanti(Lei and Simões, 2021).

## 2.4 INCIDENZA E IMPATTO ECONOMICO DELLA CHETOSI

Insieme a laminite, dislocazione abomasale, metrite, mastite, ritenzione di placenta e ipocalcemia, la chetosi fa parte delle patologie più presenti nell'allevamento della vacca da latte (Liang et al., 2017); La chetosi clinica (CK) e la chetosi subclinica (SCK) sono associate a una minore produzione di latte, a prestazioni riproduttive inferiori, a un maggiore abbattimento delle vacche e a una maggiore probabilità di altri disturbi. La quantificazione dei costi legati alla chetosi consentirà a veterinari e allevatori di prendere decisioni più informate in merito alla prevenzione e al trattamento della malattia (Steeneveld et al., 2020). La chetosi subclinica (SCK), generalmente definita come una concentrazione di betaidrossibutirrato (BHBA) nel sangue pari o superiore a  $1,4 \mu\text{mol/L}$  durante l'inizio della lattazione senza segni clinici, come una produzione di latte deludente con un elevato contenuto di grassi e un ridotto contenuto di proteine (Duffield et al., 2009), può verificarsi se i corpi chetonici nel sangue aumentano drasticamente (Steeneveld et al., 2020). Gli effetti deleteri della chetosi sulla produzione di latte sono ben documentati. Dohoo e Martin hanno dimostrato che le vacche chetotiche avevano una produzione di latte giornaliera inferiore di 1,0-1,4 kg (4,4%-6,6%) rispetto alle vacche non chetotiche (Dohoo and Martin, 1984). Inoltre, McArt, insieme ad altri ricercatori, hanno riportato che ogni ulteriore aumento di 0,1 mmol/L del  $\beta\text{OHB}$  sierico (oltre 1,2 mmol/L) alla prima diagnosi di SCK è associato a 0,5 kg/d di perdita di latte in più per i primi 30 giorni nel latte (McArt et al., 2012b; G. Zhang and Ametaj, 2020). La perdita di latte dovuta all'iperchetonemia o alla chetosi riduce di conseguenza la redditività economica dell'intero settore lattiero-caseario (G. Zhang and Ametaj, 2020). In alcuni casi, le vacche con concentrazioni elevate di corpi chetonici mostrano segni clinici e sono quindi considerate affette da chetosi clinica (CK) (Steeneveld et al., 2020). Berge e Vertenten hanno riportato una prevalenza media di CK nella mandria che varia tra lo 0,7 e il 3,5% (Berge and Vertenten, 2014). La prevalenza della SCK dipende dal cut-off BHBA utilizzato e dal metodo di selezione della mandria.

Nel 2013 è stato osservato che la prevalenza media della chetosi subclinica (soglia di BHB nel sangue  $\geq 1,2 \text{ mmol/L}$ ) in dieci Paesi europei era del 21,8% (con un range tra l'11,2 e il 36,6%) tra il 2° e il 15° giorno di lattazione (Suthar et al., 2013). Overton ed altri ricercatori

hanno stimato una prevalenza complessiva (casi totali al giorno) di iperchetonemia superiore al 20%, corrispondente a un'incidenza complessiva (nuovi casi su vacche a rischio al giorno) del 40%(Overton et al., 2017). Nel 2018 venne dimostrato che la prevalenza della chetosi subclinica era di circa il 17% in Sudafrica, il 13,3% in America centrale e meridionale, il 28,5% in Asia e il 24,85% in Oceania(Brunner et al., 2019). L'iperchetonemia è un problema importante nelle aziende lattiero-casearie, che si verifica con frequenza variabile nei diversi Paesi(Lei and Simões, 2021).

Il comprovato e noto impatto finanziario negativo inerente alla comparsa e alla risoluzione di patologie produttive, come quelle associate alla chetosi, è stato presentato come uno dei principali incentivi per l'investimento e l'implementazione di programmi di monitoraggio sanitario degli allevamenti(Lei and Simões, 2021).

Negli Stati Uniti, il costo totale per caso di chetosi/anno varia tra 129 e 289 dollari (corrispondenti a 106,32 e 238,18 euro). Il valore di 129 dollari deriva principalmente dai costi inerenti agli interventi veterinari e ai rispettivi trattamenti nelle primipare (68%) e all'aumento del numero di giorni in aperto nelle vacche multipare (47%)(Liang et al., 2017). Mentre i 289 dollari sono stati attribuiti alle perdite future di performance riproduttiva (34%), alle perdite per morte (26%) e alle perdite associate alla produttività lattiera attesa (26%)(McArt et al., 2015). In Europa, i costi variano tra 130 e 257 euro. A sua volta, è stato considerato che il 14% dei 130 euro sarebbe associato al valore perso nel latte scartato dopo il trattamento delle patologie associate alla chetosi(Mostert et al., 2018). Dei 257 euro, l'80% dei costi è attribuibile alle patologie associate alla chetosi e al conseguente abbattimento, l'11% alle perdite di produttività del latte e il 9% all'aumento dei giorni di apertura(Raboison et al., 2015). Gohary ed altri ricercatori hanno raggiunto i 203 dollari australiani (equivalenti a 167,31 euro) per ogni caso di chetosi subclinica, con il 13% derivante dall'abbattimento e dalla morte, il 22% dalle perdite produttive, il 28% dalle perdite riproduttive e il 37% dallo sviluppo di altre patologie concomitanti, sostenendo quindi che la maggior parte dei costi deriva dalle conseguenze dirette associate alla chetosi subclinica e non dai costi veterinari impliciti(Gohary et al., 2016).

Nella maggior parte degli studi analizzati sull'impatto finanziario della chetosi, si concorda sul fatto che il costo annuo di ogni caso di chetosi è dovuto principalmente alle perdite di performance riproduttiva e alla perdita di produttività del latte (Lei and Simões, 2021). Questi costi possono addirittura raddoppiare quando sono presenti patologie comunemente associate alla chetosi, come la dislocazione dell'abomaso, la mastite clinica, la metrite e la laminite, tra le altre. Inoltre, la maggior parte degli studi concorda sul fatto che i costi per caso di chetosi all'anno sono doppi o superiori nelle vacche pluripare rispetto alle primipare (Lei and Simões, 2021). Assegnando un costo medio di 289 dollari per caso (sia primipare che pluripare), in una prevalenza del 21,8% in una mandria di 100 vacche, le perdite risultanti sarebbero da 4425 a 6.300 dollari (corrispondenti a 3646,93 e 5.192,24 euro) per un periodo di transizione della mandria, a seconda del modello di calcolo scelto (Gruber and Mansfeld, 2019). È facile quindi capire quanto questa patologia possa essere dannosa e costosa sia per la vacca che per l'allevatore e quanto sia importante sapere come prevenire e diagnosticare precocemente questa malattia.

### **3 APPROCCI DIAGNOSTICI E BIOMARCATORI**

Le concentrazioni di corpi chetonici nel sangue, nelle urine e nel latte sono state utilizzate per molti anni per la diagnosi della chetosi nelle vacche da latte. Le concentrazioni di  $\beta$ OHB nel sangue sono state utilizzate come test "gold standard" per la chetosi, poiché il  $\beta$ OHB è il corpo chetonico predominante nei ruminanti ed è più stabile di Ac (acetone) e AcAc (acetoacetato) (G. Zhang and Ametaj, 2020). Il valore di cut-off più comunemente utilizzato per la SCK (chetosi subclinica) è  $\geq 1400 \mu\text{mol/L}$  di BHBA ematico, mentre la CK (chetosi clinica) è generalmente diagnosticata da livelli molto più elevati di BHBA ematico  $\geq 3000 \mu\text{mol/L}$  (Oetzel, 2004). Non ci sono requisiti speciali per il campionamento dei campioni di sangue. Tuttavia, il test del  $\beta$ OHB nel sangue non deve essere eseguito su campioni di sangue prelevati dalla vena mammaria. È stato riportato che la concentrazione di  $\beta$ OHB nel sangue della vena mammaria è più bassa perché la ghiandola mammaria tende a estrarre il  $\beta$ OHB e rilascia AcAc (G. Zhang and Ametaj, 2020). La quantificazione del  $\beta$ OHB sierico può essere

eseguita con un metodo colorimetrico mediante un kit commerciale e rilevata con un lettore di micropiastre (G. Zhang et al., 2015). Altri metodi, tra cui la determinazione fluorimetrica, la gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) e la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR), sono stati utilizzati per verificare i livelli ematici di  $\beta$ OHB e Ac(G. Zhang and Ametaj, 2020). Mentre le concentrazioni di  $\beta$ OHB e Ac del latte sono state misurate con la spettrometria infrarossa a trasformata di Fourier per rilevare la SCK(de Roos et al., 2007).Oltre ai corpi chetonici, sono stati utilizzati anche altri componenti del latte per rilevare la SCK nelle vacche da latte. Il rapporto tra la percentuale di grasso del latte e la percentuale di proteine del latte è stato utilizzato come strumento per valutare la prevalenza della SCK. Un rapporto grasso/proteine del latte (F/P) superiore a 1,5 indica che la vacca è affetta da SCK(G. Zhang and Ametaj, 2020).

Tutti e tre i principali fluidi corporei (sangue, urina e latte) possono essere utilizzati per i test rapidi sulla chetosi(G. Zhang and Ametaj, 2020). Il biosensore portatile per la misurazione dei chetoni nel sangue (Precision Xtra™ meter®) è ampiamente utilizzato per il test  $\beta$ OHB nel sangue della vacca per la diagnosi della chetosi nelle vacche da latte dopo il parto (Heuwieser et al., 2007). L'urina, in quanto fluido corporeo facilmente accessibile, può essere utilizzata per valutare la chetosi con un test a lato della vacca. L'esame delle urine della vacca più utilizzato per il monitoraggio della chetosi è un dipstick semiquantitativo (striscia di urina Ketostix®; Bayer Corp. Diagnostics Division, Elkhart, IN, USA) che misura l'AcAc (G. Zhang and Ametaj, 2020). Le compresse di nitroprussiato (Acetest®; Bayer Corp. Diagnostics Division, Elkhart, IN, USA) sono state indicate come un approccio per la valutazione quantitativa dell'AcAc urinario per la diagnosi della chetosi a livello della vacca(Nielen et al., 1994).

I test per la chetosi sul latte delle vacche presentano un notevole vantaggio rispetto ai test sul sangue e sulle urine per quanto riguarda la facilità di raccolta del latte e la garanzia che tutte le vacche della mandria possano essere testate al momento della mungitura(G. Zhang and Ametaj, 2020). La striscia reattiva per il  $\beta$ OHB del latte (nota anche come KetoTest®, Ketolac®  $\beta$ OHB e Sanketopaper® in diversi Paesi) è il test più promettente per la chetosi(Oetzel, 2004). I limiti dei test sul latte bovino sono che in genere non sono sensibili come i test sulle urine nel monitoraggio della chetosi. Nonostante i vantaggi o gli svantaggi

dei test sulle urine o sul latte, nessuno di essi presenta sensibilità e specificità eccellenti rispetto al test "gold standard" della  $\beta$ OHB ematica (G. Zhang and Ametaj, 2020). Oltre ai test di laboratorio o alle strisce per la chetosi, esiste anche un flusso crescente di test del latte in linea forniti da diverse aziende con sensori in grado di determinare automaticamente i componenti del latte, tra cui il rapporto F/P e altri componenti del latte. Questi test forniscono anche test per la chetosi per individuare la SCK in una fase precoce della malattia (G. Zhang and Ametaj, 2020).

### **3.1 CATALISI ENZIMATICA**

È il test tradizionale che utilizza uno spettrofotometro a raggi ultravioletti o un analizzatore biochimico per determinare il BHB nel siero del sangue (Lei and Simões, 2021). Questo metodo è considerato il gold standard e consiste in una reazione enzimatica colorimetrica seguita da un'analisi spettrofotometrica (Benedet et al., 2019). Oltre che nel sangue, le concentrazioni di BHB possono essere misurate anche nel latte con un analizzatore biochimico, poiché è stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa ( $r = 0,705$ ,  $p < 0,01$ ) tra BHB nel siero del sangue e del latte (Lei and Simões, 2021).

### **3.2 SPETTROMETRIA INFRAROSSA CON TRASFORMATATA DI FOURIER (FTIR)**

La spettroscopia a infrarossi si basa sulla diversa rotazione di ogni molecola che determina l'energia della lunghezza d'onda infrarossa che viene assorbita; la lunghezza d'onda assorbita viene rilevata dallo spettroscopio a infrarossi, che presenta quindi lo spettro di assorbimento individuale di ogni molecola, consentendo di identificare ogni molecola o sostanza in base alle bande di assorbimento nel suo spettro. La combinazione con la trasformazione di Fourier ha permesso la trasformazione matematica dell'interferenza delle diverse onde dell'intero spettro della stessa sostanza, in una sola volta (Lei and Simões, 2021). È dagli anni '90 che viene utilizzato da diversi laboratori e organizzazioni competenti in tutto il mondo per determinare la composizione del latte (grassi, proteine, lattosio e urea) mensilmente nei controlli ufficiali del latte, in quanto consente di elaborare rapidamente molti campioni, a un basso costo per unità, senza effetti distruttivi sulla composizione del latte (J. J. Gross and Bruckmaier, 2019).

Con questo prezioso metodo, è possibile misurare le concentrazioni di BHB e acetone nel latte per monitorare gli animali sospetti e individuare prima la chetosi subclinica (Tehrani-Sharif et al., 2012).

### **3.3 FLUORIMETRIA**

Questo metodo permette di misurare la concentrazione di BHB nel latte o nel plasma sanguigno. Le analisi si basano su un metodo enzimatico di ossidazione del BHB, seguito da un secondo processo di ossidazione del nicotinammide adenina dinucleotide più idrogeno (NADH) prodotto con la resazurina che produce, in proporzione, un composto fluorescente, la resorufina (Lei and Simões, 2021). Larsen e Nielsen hanno verificato che i risultati di questo test non sono compromessi dalla mancanza di pretrattamento dei campioni di plasma o latte; ciò semplifica il processo rendendolo in grado di gestire molti campioni, in linea e in modo automatizzato (Larsen and Nielsen, 2005).

### **3.4 CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO (GLC), SPETTROSCOPIA DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (NMR) E GASCROMATOGRAFIA-SPETTROMETRIA DI MASSA (GC-MS).**

Utilizzando l'<sup>1</sup>N-propanolo, la GLC può essere utilizzata per determinare l'acetone e il BHB nel latte o nel siero del sangue. D'altra parte, NMR e GC-MS possono essere utilizzati solo nel sangue per determinare i valori di acetone e BHB (Tehrani-Sharif et al., 2012).

La NMR è una tecnica non distruttiva, altamente accurata e riproducibile, ma meno sensibile e meno completa della MS. La combinazione di MS e cromatografia aumenta la sensibilità della tecnica (Lei and Simões, 2021).

Essendo eseguite in laboratorio tutte queste analisi sono soggette a ritardi. Di conseguenza, l'industria ha sviluppato apparecchiature alternative che possono essere utilizzate dai produttori e che offrono risultati in tempo reale: i test a bordo vacca (Lei and Simões, 2021). Diversi tipi di test diagnostici, da utilizzare in campo, sono disponibili sul mercato. La maggior parte di questi test rileva l'acetoacetato o l'acetone nelle urine o il BHB nel latte. I test sono considerati semiquantitativi poiché si basano sul cambiamento di colore della polvere di nitroprussiato (quando viene aggiunto il campione) o del nitroprussiato impregnato nelle aree reattive dei dipsticks, che è generalmente più intenso in presenza di concentrazioni più

elevate di corpi chetonici nel campione(Iwersen et al., 2009). I loro componenti principali sono il carbonato di sodio, il persolfato di ammonio e il nitroprussiato di sodio. In condizioni alcaline, l'acetoacetato reagisce con il nitroprussiato di sodio, determinando un cambiamento di colore da bianco a viola, che diventa un colore viola più scuro con una maggiore quantità di chetoni(Lei and Simões, 2021). Oltre alla minore sensibilità e specificità rispetto al test gold standard, l'affidabilità di questi metodi è inferiore perché si basano su un'interpretazione visiva soggettiva del cambiamento di colore(Tehrani-Sharif et al., 2012). Tuttavia, questi test sono solitamente più economici, più semplici da usare e offrono risultati immediati rispetto ai precedenti, rendendoli più utili per formulare o escludere una diagnosi clinica di chetosi in una vacca malata sospetta(Lei and Simões, 2021).

### **3.5 COW-SIDE TESTS**

Rispetto alle analisi di laboratorio, i test condotti sulle vacche presentano diversi vantaggi, tra cui costi inferiori, risultati immediati e minore manodopera. Tutti e tre i principali fluidi corporei (sangue, urina e latte) possono essere utilizzati per i test rapidi sulla chetosi(G. Zhang and Ametaj, 2020).

#### **3.5.1 Cow-side test nelle urine**

Nelle urine può essere valutato l'acetoacetato utilizzando compresse di nitroprussiato (Acetest®; Bayer Corp. Diagnostics Division, Elkhart, IN, USA), offrendo un'ottima sensibilità ma presentando solitamente una scarsa specificità (rispetto agli esami del sangue per valutare il BHB), rendendolo utile solo per valutare le vacche malate individualmente e non per il monitoraggio della mandria(Lei and Simões, 2021). Questo stesso corpo chetonico può essere misurato con un dipstick semiquantitativo (Ketostix®; Bayer Corp., Diagnostics Division, Elkhart, IN, USA) con sensibilità simile e migliore specificità rispetto al test precedente(Oetzel, 2004). Tuttavia, queste strisce sono più costose di altri test per i chetoni dell'urina, il che rende il loro uso sulle urine poco pratico. Il costo per striscia di questo test è di 0,20 dollari(Lei and Simões, 2021). Secondo il produttore, l'urina deve essere raccolta da cateterismo, minzione spontanea o indotta dalla manipolazione manuale dell'uretra distale. Alcuni dei risultati possono essere falsi positivi e si ritiene che esso sia dovuto ad un

contatto prolungato tra il reagente e l'urina. Il punto più debole di questi due test è la difficoltà di raccogliere campioni di urina rispetto a quelli di latte, che li rende più costosi di altre alternative(Oetzel, 2015).

### **3.5.2 Cow-side test nel latte**

Per valutare l'acetoacetato del latte si può utilizzare il nitroprussiato in polvere (i più comuni: Utrecht powder; Università di Utrecht, Utrecht, Paesi Bassi e KetoCheck™ powder; Great States, St. Joseph, MO, USA); tuttavia, questi test hanno generalmente una sensibilità molto scarsa (rispetto agli esami del sangue per la valutazione del BHB) e quindi non possono essere raccomandati come test di riferimento per il monitoraggio della mandria(Lei and Simões, 2021). Tuttavia hanno un vantaggio rispetto agli esami delle urine, come una raccolta più semplice, che assicura che tutte le vacche idonee per il monitoraggio possano essere testate (Oetzel, 2015). Il costo per test varia da 0,50 a 1,00 dollari(Lei and Simões, 2021).

### **3.5.3 Cow-side test sul sangue**

Vengono utilizzati dei dispositivi elettronici portatili che comprendono apparecchi portatili e strisce reattive che, a contatto con una piccola quantità di sangue, sviluppano una reazione elettrochimica che determina la concentrazione del chetone nel sangue con elevata sensibilità e specificità(Lei and Simões, 2021). Per esempio, esiste il Precision Xtra® (di Abbott Diabetes Care, Abingdon, Regno Unito), che oltre ad analizzare campioni di sangue, funziona anche con campioni di latte e urina. Un altro vantaggio è che questa apparecchiatura non richiede una precedente calibrazione. Il monitoraggio con misuratori portatili di BHB è quindi diventato uno dei metodi di scelta per rilevare la chetosi sul campo. Tuttavia, sebbene efficiente, si tratta di un metodo laborioso e costoso. Il costo del misuratore è di circa 30,00 dollari, con l'aggiunta di circa 1,30 dollari per striscia(Lei and Simões, 2021). La vena mammaria non dovrebbe essere utilizzata per raccogliere campioni di sangue, perché in questo caso la concentrazione di BHB è più bassa, in quanto viene consumata dai tessuti della mammella. Inoltre, il prelievo di sangue mediante venipuntura comporta intrinsecamente e inevitabilmente, anche per un breve periodo, l'applicazione di manovre di contenimento dell'animale(Oetzel, 2004). A causa delle conoscenze tecniche e

dell'abilità necessarie per eseguire la raccolta e del rischio di lesioni a cui possono essere esposti sia gli animali che gli esseri umani, questa procedura dovrebbe essere eseguita solo da veterinari o da altro personale addestrato, per garantire una raccolta rapida e minimamente stressante(J. J. Gross and Bruckmaier, 2019).

Inoltre, sebbene i campioni di sangue consentano un'analisi precisa di diversi parametri, un campione di sangue di per sé rappresenta solo lo stato dell'animale al momento del prelievo(Lei and Simões, 2021). Non è possibile effettuare prelievi frequenti e regolari per la diagnosi precoce o il monitoraggio dello sviluppo di patologie metaboliche, a maggior ragione se pensati per un'intera mandria(J. J. Gross and Bruckmaier, 2019). Di conseguenza i dati ottenuti con mezzi non invasivi, come il latte, saranno un'alternativa migliore per monitorare il metabolismo e la salute degli animali. Sapendo che sia lo stato di salute che lo stato metabolico di una vacca da latte hanno un impatto sulle sue prestazioni casearie e sulla qualità del latte, con l'evolversi dello stato metabolico durante la lattazione si osserveranno cambiamenti nella composizione del latte. Tuttavia, l'analisi di campioni mensili limita l'individuazione di patologie o la valutazione del rischio a livello individuale(Lei and Simões, 2021).

### **3.6 ALTRI TEST DISPONIBILI PER LA DIAGNOSI DI CHETOSI**

#### **3.6.1 Rapporto Grasso/Proteine (F/P)**

La quantità/proporzione di grasso e proteine nel latte sono variabili influenzate da fattori quali la razza (genotipi), la gestione alimentare, la performance produttiva, il livello metabolico e lo stato di salute(J. J. Gross and Bruckmaier, 2019). I lipidi della dieta vengono trasferiti alla frazione lipidica del latte senza richiedere il dispendio energetico associato alla sua sintesi, e i ruminanti utilizzano preferenzialmente l'acetato nella lipogenesi a scapito del glucosio(Lei and Simões, 2021). Si prevede che poco dopo il parto i livelli di grasso e proteine nel latte raggiungano il picco massimo e che successivamente diminuiscano con l'aumento della produzione di latte, fino al picco della lattazione(J. Gross et al., 2011b). L'evoluzione inversa si verificherà dopo il plateau di produzione massima; la quantità di grasso e proteine

nel latte aumenta gradualmente con la diminuzione della produzione di latte (J. J. Gross and Bruckmaier, 2019). Si ipotizza quindi che la quantità di grasso e proteine nel latte riflette lo stato energetico della bovina. Tuttavia, durante le fasi di deficit energetico, come l'inizio e la fine della lattazione, i livelli di grasso nel latte aumentano e quelli di proteine diminuiscono (Lei and Simões, 2021). Avendo verificato che nel NEB all'inizio della lattazione la concentrazione di grasso nel latte tende ad aumentare, mentre quella di proteine tende a diminuire, il rapporto F:P è stato suggerito come potenziale indicatore di un apporto energetico alimentare insufficiente (Lei and Simões, 2021). L'aumento del rapporto F:P coincide con periodi di NEB associati a una maggiore mobilitazione delle riserve lipidiche; rapporti superiori a 1,35 corrispondono a vacche in deficit energetico (J. Gross et al., 2011b). La diminuzione di questo è generalmente associata a una minore produzione di VFA (soprattutto acetato e butirato, che sono i precursori della sintesi degli acidi grassi nella ghiandola mammaria) che può incorrere in una acidosi ruminale subclinica (J. J. Gross and Bruckmaier, 2019). Nel 2015, Jenkins et al. hanno studiato le soglie per il rapporto F:P e hanno determinato matematicamente che il cutoff ottimale per una diagnosi di chetosi subclinica ( $[BHB] \geq 1,2$  mmol/L nel sangue) sarebbe 1,42 per una sensibilità del 92% e una specificità del 65%; tuttavia la sua specificità comporterebbe un alto tasso di falsi positivi (Jenkins et al., 2015). Hanno quindi determinato che la soglia ottimale per un maggiore equilibrio tra sensibilità e specificità sarebbe 1,50 per una sensibilità del 75% e una specificità del 78% (Lei and Simões, 2021).

Tuttavia, il rapporto F:P non è un metodo adeguato all'individuazione precoce dell'iperchetonemia, poiché le variazioni del grasso del latte riflettono lo stato di salute della vacca solo se ha già subito o sta subendo gli effetti della malattia (Lei and Simões, 2021). Un altro fattore aggravante dell'imprecisione del rapporto F:P come indicatore di iperchetonemia è che il contenuto di grasso e proteine del latte è determinato da fattori diversi dal bilancio energetico all'inizio della lattazione (King et al., 2019). Il contenuto di grasso del latte può anche riflettere, oltre al livello di NEFA e alla dieta, la salute ruminale (alterata, ad esempio, nei casi di acidosi subclinica), che può avere grandi effetti durante questo periodo. Allo stesso modo, anche i fattori dietetici influenzano in modo significativo il contenuto proteico del latte (Lei and Simões, 2021).

### **3.6.2 Contenuto di urea nel latte**

L'interpretazione della concentrazione di urea nel latte deve sempre essere fatta in parallelo con la concomitante quantità di proteine nel latte (Lei and Simões, 2021). Per la produzione del latte è indispensabile un maggiore apporto di proteine nella dieta per cui ci si aspetta che, all'aumento della produzione, aumenti la concentrazione di urea nel latte. Tuttavia, questo non si verifica perché l'inizio della lattazione è accompagnato da una diminuzione dell'assunzione di sostanza secca e dall'installazione di NEB (Lei and Simões, 2021). Di conseguenza nelle prime settimane di lattazione si osservano basse concentrazioni di proteine e di urea nel latte, indicative di un insufficiente apporto di energia e di proteine alimentari, che limita, di conseguenza, l'attività ottimale della flora ruminale, che sintetizzerà quindi un numero di aminoacidi inferiore a quello destinato all'assorbimento intestinale (J. J. Gross and Bruckmaier, 2019). elevate concentrazioni di urea nel latte, che coesistono con livelli normali o ridotti di proteine nel latte, suggeriscono un apporto eccessivo di proteine e insufficiente di energia nella dieta, avvalorando la necessità di un apporto adeguato e sincrono di energia e azoto al biota ruminale (Lei and Simões, 2021). La deaminazione di tutte le proteine ingerite al di sopra del fabbisogno reale contribuirà all'aumento della produzione di azoto (sotto forma di ammoniaca), che viene eliminato sotto forma di urea nelle urine e nel latte. Questo perché il metabolismo dell'azoto richiede energia che, all'inizio della lattazione, è prioritariamente destinata alla produzione di latte. La concentrazione di urea nel latte, vista la correlazione stretta con la concentrazione di quest'ultima nel sangue e la sua associazione con il contenuto proteico della dieta, essa si rivela utile per monitorare l'apporto proteico ed energetico della dieta e le emissioni ambientali di azoto (Lei and Simões, 2021).

### **3.6.3 Profilo degli acidi grassi nel latte**

Le variazioni nel contenuto di grasso del latte e persino nelle proporzioni di un singolo acido grasso ci permettono di valutare lo stato metabolico delle vacche da latte (Stoop et al., 2009). Gli acidi grassi (FA) presenti nel latte provengono dalla dieta, dalla sintesi "de novo" nella ghiandola mammaria, dalla bioidrogenazione o dalla degradazione batterica nel ruminale e dalla mobilitazione del grasso corporeo (Lei and Simões, 2021). I FA alimentari

vengono incorporati nel latte subito dopo il loro assorbimento. Dal processo di lipolisi nel tessuto adiposo, principalmente durante la NEB, arrivano alla ghiandola mammaria soprattutto acidi grassi a catena lunga (saturi e insaturi) e dalla lipogenesi di precursori non lipidici, come i carboidrati, nella ghiandola mammaria risultano acidi grassi a catena corta e media (J. J. Gross and Bruckmaier, 2019). La proporzione di acidi grassi a catena corta e media è più bassa all'inizio della lattazione, per poi aumentare, mentre la proporzione di FA monoinsaturi, in particolare l'acido oleico, diminuisce con il ripristino del bilancio energetico dopo il parto (Lei and Simões, 2021). La lipolisi del tessuto adiposo precede lo sviluppo della chetosi per cui, valutando la concentrazione di un determinato FA (acido oleico), è possibile rilevare precocemente la chetosi subclinica. Tuttavia, bisogna tenere conto dell'intervento della dieta nella composizione dei FA del latte (J. J. Gross and Bruckmaier, 2019). L'integrazione di grassi, come l'acido oleico, attenua il deficit energetico aumentando la concentrazione di grasso del latte e la percentuale di FA (Lei and Simões, 2021). Studi recenti hanno dimostrato che parametri misurati nel latte diversi dal BHB, come la concentrazione di NEFA prevista nel sangue e la concentrazione di FA sintetizzati "de novo", se analizzati in qualsiasi momento durante i primi 18 giorni di lattazione, sono associati a un aumento del rischio di sviluppare patologie o di allontanare l'animale dalla mandria nei primi 30 giorni di lattazione (Lei and Simões, 2021). Nei ruminanti, il BHB è utilizzato come precursore della sintesi "de novo" degli acidi grassi nella ghiandola mammaria. Nel loro studio, Zhang e altri ricercatori hanno dimostrato che valori elevati di BHB (1,2 e 2,4 mmol) inducono la lipogenesi nelle cellule epiteliali mammarie in vitro, in quanto inducono l'attivazione di fattori di trascrizione lipogenici e aumentano l'espressione degli enzimi di sintesi lipidica (Lei and Simões, 2021; M. Zhang et al., 2015).

#### **3.6.4 NEFA nel sangue**

Mentre la concentrazione di BHB aumenta quando il fegato non riesce più a compattare l'eccessivo apporto di NEFA, motivo per cui vengono convertiti in corpi chetonici, la concentrazione di NEFA riflette il fabbisogno energetico dell'animale che viene sostenuto dalla mobilitazione delle riserve lipidiche (Lei and Simões, 2021). Le vacche con concentrazioni ematiche di NEFA superiori alle soglie, antepartum e/o nel primo

postpartum, sono a maggior rischio di chetosi, pertanto, la concentrazione di NEFA è un buon indicatore del livello di mobilitazione delle riserve lipidiche corporee ed è, quindi, più utile per il monitoraggio nel periodo precedente al parto, mentre la concentrazione di BHB, come indicatore dell'entità della chetogenesi, diventa più utile nel periodo postpartum (Lei and Simões, 2021). I valori di NEFA possono essere più stabili rispetto al BHB nel corso della giornata; i valori di NEFA sono più suscettibili di errori di lettura, dovuti allo stress al momento del prelievo e a una manipolazione inadeguata del campione. Inoltre, l'elaborazione di campioni di sangue o siero per il test NEFA è limitata dalla necessità di un laboratorio diagnostico e il costo per campione è di circa 11,00 dollari. (Lei and Simões, 2021). Al contrario, il BHB è più facile da misurare e meno costoso. Per questo motivo, il BHB dovrebbe essere la prima scelta per il monitoraggio e, quando vi sono prove che le vacche in transizione di una mandria presentano problemi senza un aumento significativo del BHB, si dovrebbe valutare il NEFA (Lei and Simões, 2021)

## 4 TRATTAMENTO E PREVENZIONE DELLA CHETOSI

---

### 4.1 TERAPIA

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

Per evitare l'insorgenza di chetosi nelle vacche da latte, è importante fornire un supplemento di gluconeogenesi(F. Zhang et al., 2020). In passato, il primo approccio per la gestione della chetosi clinica è stato l'utilizzo del destrosio; un bolo di 500 mL di soluzione contenente il 50% di destrosio è capace di incrementare di 8 volte il valore di glucosio ematico immediatamente in seguito a somministrazione(Gordon et al., 2013), riduce la secrezione di glucagone e la concentrazione plasmatica di NEFA(Constable et al., 2016) ma dopo 15 minuti aumenta di 12 volte il valore di insulina circolante. Pertanto, l'utilizzo di destrosio può risultare utile in animali che presentano segni neurologici, ma deve essere seguito da ulteriori trattamenti per favorire un successo a lungo termine(Gordon et al., 2013).

I glucocorticoidi sono stati utilizzati nel trattamento della chetosi per la loro capacità di produrre iperglicemia come risultato di cambiamenti nell'utilizzo del glucosio(Thomas H. Herdt and Emery, 1992). Gli steroidi bloccano anche gli effetti dell'insulina, consentendo un aumento del catabolismo delle riserve di grasso e proteine. Le concentrazioni plasmatiche di glucosio e insulina aumentano significativamente circa 48 ore dopo l'iniezione di desametasone(Gordon et al., 2013).

Per il suo effetto anabolizzante(Hayirli, 2006), anche l'insulina è stata considerata per il trattamento della chetosi; essa riduce la mobilitazione del grasso dalle riserve tissutali, favorisce l'ingresso del glucosio nelle cellule e stimola la glicolisi nel fegato. L'insulina umana a lunga durata d'azione è più comunemente somministrata alla dose di 0,25 UI/kg di peso corporeo per via sottocutanea ogni 24-48 ore(Tufarelli et al., 2024). Il suo utilizzo complessato ad altri composti, come glucocorticoidi e destrosio, è risultato essere efficace rispettivamente nell'aumentare il tasso di cura e la produzione di latte, e nel diminuire la

concentrazione di BHB plasmatico e aumentare quella di glucosio e insulina 6 giorni dopo il trattamento(Sakai et al., 1993). Ciononostante, l'evidenza della sua efficacia rimane comunque limitata; questo, associato al costo elevato delle preparazioni preclude l'utilizzo dell'insulina su larga scala(Gordon et al., 2013).

Uno dei trattamenti più efficaci risulta essere l'utilizzo di precursori del glucosio: glicole propilenico e il glicerolo(Gordon et al., 2013) ); il primo più efficace poiché è stato dimostrato che il glicole propilenico (PG) è più efficace nell'aumentare la concentrazione plasmatica di glucosio rispetto al glicerolo. 300 ml di PG sono efficaci quanto 600 ml di glicerolo(F. Zhang et al., 2020), quindi è necessaria la metà della dose per favorire l'aumento della glicemia(Piantoni and Allen, 2015). Il glicole propilenico (1, 2-propandiolo;  $C_3H_8O_2$ ) è un liquido dolce, igroscopico e viscoso che ha proprietà gluconeogeniche e viene utilizzato di routine per i suoi effetti terapeutici sulle vacche affette da chetosi, basandosi sulla premessa che aumenta rapidamente il glucosio nel sangue(F. Zhang et al., 2020). Quello che accade è che della fermentazione del PG il principale prodotto sarà il propionato, che può essere rapidamente metabolizzato con un breve tempo di ritardo(Ferraro et al., 2009). Questo è vantaggioso per le vacche per alleviare la NEB. Dopo la somministrazione orale, la maggior parte del PG fuoriesce dalla parete del rumine o dal tratto gastrointestinale e viene convertito in glucosio dal fegato(Rizos et al., 2008). Tuttavia, l'altro meccanismo degli effetti del PG prevede la produzione successiva di propionato insieme al propanale e la conversione di quest'ultimo in propanolo nel rumine, che a sua volta viene convertito in propionato e quindi in glucosio nel fegato(F. Zhang et al., 2020). L'effetto principale del PG è quello di aumentare lo stato glucogenico e, di conseguenza, la concentrazione di BHBA plasmatica si riduce e le vacche hanno un minor rischio di sviluppare chetosi(Bjerre-Harpøth et al., 2015). Il PG viene metabolizzato a lattato, acetato e piruvato nel fegato. Il lattato entra nella gluconeogenesi attraverso il piruvato, che può essere convertito in ossalacetato. La concentrazione di ossalacetato è il metabolita chiave per determinare se l'acetil-CoA entra nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) o nella chetogenesi(F. Zhang et al., 2020). Quando l'ossalacetato è insufficiente perché la citrato sintasi si combini con l'acetil-CoA, l'acetil-CoA in eccesso viene ripartito verso la sintesi chetonica(F. Zhang et al., 2020)(Figura 6). Le proprietà anti-chetogeniche del PG sono in parte dovute all'aumento dell'ossidazione

dell'acetil-CoA nel ciclo TCA e all'apporto di glucosio gluconeogenico(Nielsen and Ingvarsten, 2004).

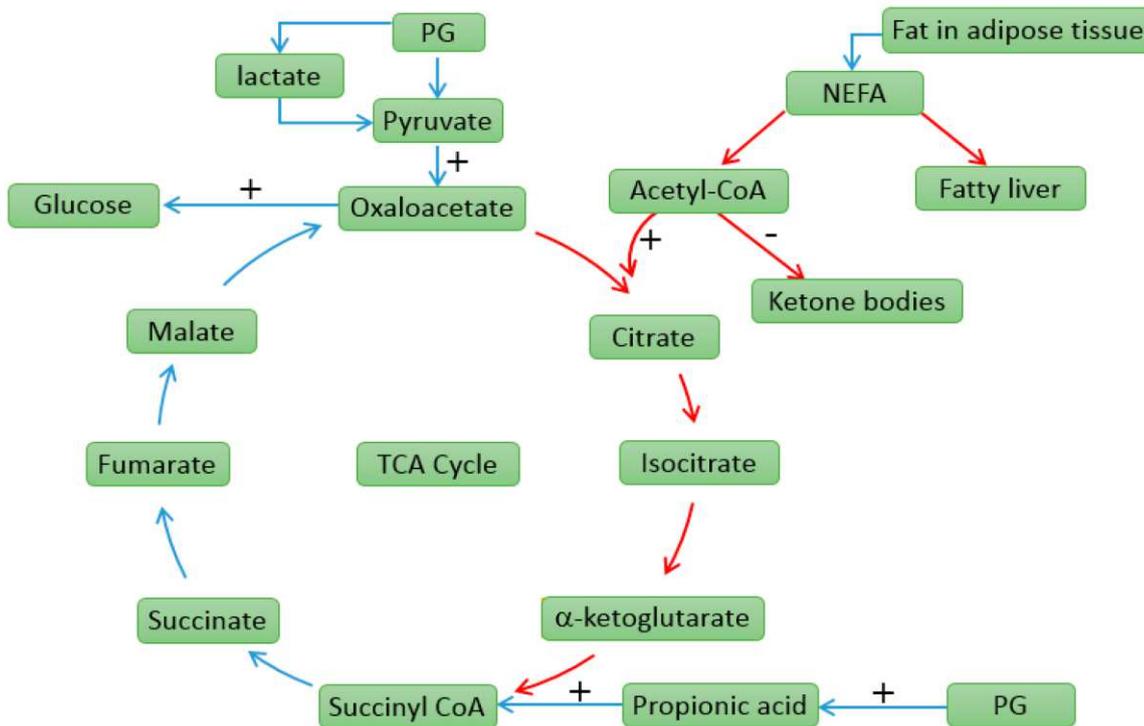


Figura 6: Le vie anti-chetogeniche del glicole propilenico (PG) nelle vacche da latte. Le linee blu descrivono le vie gluconeogeniche per aumentare il glucosio e prevenire la chetosi. Le linee rosse rappresentano le vie per aumentare l'ossidazione dell'acetil-CoA (coenzima A) nel ciclo degli acidi tricarbossilici (ciclo TCA) e l'apporto di glucosio aumentando la produzione di ossalacetato, che impedirà all'acetil-CoA di convertirsi in corpi chetonici ( $\beta$ -idrossibutirrato, acetone e acetoacetato). Il PG può anche ridurre l'accumulo di triacilglicerolo (TG) nel fegato(F. Zhang et al., 2020).

L'utilizzo del glicole propilenico nell'immediato post-parto può portare ad un aumento della produzione latte(McArt et al., 2011) e una diminuzione del 40% dell'incidenza di dislocazione abomasale(McArt et al., 2012a). Associato a questi, il glicole propilenico può fornire un supporto alle performance riproduttive, in particolare il concepimento alla prima inseminazione, la funzione ovarica e la crescita follicolare(F. Zhang et al., 2020).

Per quanto riguarda i quantitativi indicati per la somministrazione orale di precursori metabolici dei carboidrati, il glicole propilenico 225 g, 2 volte al giorno per due giorni, poi 100 g, 1 volta al giorno per due giorni e glicerolo 500 g, 2 volte al giorno per 10 giorni(Tufarelli

et al., 2024). Bisogna prestare particolare attenzione al dosaggio poiché dosi elevate di glicole propilenico (>500 g/d) hanno effetti tossici e collaterali sulle vacche da latte a causa dei composti tossici del PG durante i processi metabolici(F. Zhang et al., 2020).

Nel trattamento e nella profilassi della chetosi, viene utilizzata una terapia aggiuntiva con vitamine e minerali(Tufarelli et al., 2024). Agli animali chetotici vengono somministrati vitamina B12, cobalto, niacina (6 g per via orale) e nicotinamide. In presenza di sintomi di coinvolgimento del sistema nervoso centrale, è indicata la somministrazione di idrato di cloralio. Oltre al suo effetto sedativo, è stato dimostrato che l'idrato di cloralio aumenta la concentrazione di acido propionico nel rumine. La dose iniziale è di 30 g per via orale e il trattamento prosegue con una dose di 7 g, 2 volte al giorno per diversi giorni(Tufarelli et al., 2024). I migliori risultati nel trattamento e nella profilassi della chetosi nelle vacche da latte ad alto rendimento sono stati ottenuti con l'uso dello ionoforo monensin. La monensina agisce sulla micropopolazione del rumine, diminuendo la popolazione di Gram positivi, protozoi e funghi e aumentando la popolazione di Gram-negativi. Questo comporta un aumento della disponibilità di acido propionico e sopprime la mobilitazione dei grassi e, di conseguenza, la formazione di corpi chetonici(Tufarelli et al., 2024). Quindi il Monensin è in grado di ridurre la prevalenza, l'incidenza e la durata della chetosi clinica e subclinica, con una riduzione del BHB sierico, dell'acetoacetato e delle concentrazioni di NEFA(Constable et al., 2016).

## **4.2 PREVENZIONE**

I fattori di rischio più diffusi per lo sviluppo della iperchetonemia sono l'aumento della parità (numero di lattazioni), le elevate concentrazioni di NEFA nel periodo precedente il parto, le condizioni corporee elevate, la stagione del parto, la durata del periodo di asciutta, la durata della lattazione precedente, i litri di colostro (Lei and Simões, 2021), il basso apporto di nutrienti, l'attività ruminale, i fattori specifici dei nutrienti o della dieta e lo stress gestionale e ambientale (K. L. Ingvarsen, 2006). La chetosi è più probabile che si verifichi nelle vacche ad alta produttività, a causa dell'elevata richiesta di energia e nutrienti (Lei and Simões, 2021).

### **4.2.1 Attività ruminale**

È stato dimostrato che rispetto a quelle che ricevono diete che forniscono energia ben al di sopra del fabbisogno di mantenimento, le vacche alimentate nel periodo di asciutta con diete a energia limitata/controllata, hanno un rischio minore di essere colpite da chetosi nel periodo post-partum, senza pregiudicare la produzione di latte (Mann et al., 2015). Questi animali hanno manifestato una NEB meno profonda ed episodi di chetosi in misura e numero minore (Lei and Simões, 2021). Il monitoraggio dell'attività ruminatoria durante il periparto, ad esempio con l'uso di collari di ruminazione, può contribuire all'identificazione individuale e tempestiva delle patologie della fase iniziale della lattazione (Lei and Simões, 2021). In uno studio fatto da Kaufman ed altri ricercatori, è stato scoperto che le vacche pluripare che avevano ridotto il tempo di ruminazione (di circa  $25 \pm 12,8$  min/giorno in meno rispetto alle vacche sane tra la 2a settimana prima del parto e la 4a settimana dopo il parto) nella settimana immediatamente precedente il parto avevano maggiori probabilità di essere affette da chetosi (Kaufman et al., 2016). Inoltre, quelle che manifestavano questa riduzione (circa  $44 \pm 15,6$  min/giorno in meno rispetto alle vacche sane tra la seconda settimana prima del parto e la quarta settimana dopo il parto) nella settimana immediatamente successiva al parto erano più probabilmente affette non solo da chetosi, ma anche da un'altra patologia dell'inizio della lattazione (Kaufman et al., 2016; Lei and Simões, 2021). Schirmann ed altri ricercatori hanno dimostrato che le vacche con chetosi post-partum ( $\text{BHB} \geq 1,2$  mmol/L)

hanno trascorso il 14% del tempo in meno a ruminare durante il pre parto rispetto alle vacche sane (Lei and Simões, 2021; Schirmann et al., 2016).

#### **4.2.2 BCS**

Il monitoraggio del BCS delle vacche nel periodo precedente al parto si è rivelato uno strumento utile nella gestione della salute della mandria e nella prevenzione contro la chetosi (John R. Roche et al., 2013). È stato riscontrato che punteggi elevati nella valutazione del BCS (>3,25) prima del parto erano associati a un'elevata perdita di massa corporea nelle prime settimane postpartum, poiché questi animali sperimentavano tassi più elevati di mobilizzazione del grasso; questo fenomeno è stato dimostrato dall'aumento delle concentrazioni di NEFA e BHB circolanti (Busato et al., 2002). Per questo monitoraggio è possibile utilizzare la tabella di classificazione del BCS di Edmonson (scala da 1 emaciato a 5 gravemente sovracondizionato, con incrementi di 0,25 punti). Dato il legame tra il grasso corporeo al parto, il successivo grado di mobilizzazione e il rischio di disturbi digestivi e metabolici e di malattie infettive, è chiaramente importante gestire le vacche in modo che partoriscono con il grasso corporeo ottimale. La condizione corporea ottimale al parto è di circa 3,25 su una scala da 1 a 5 (K. L. Ingvarsen, 2006). Questo livello di riserve corporee consente alla vacca di far fronte a eventuali future carenze alimentari senza incorrere in tassi eccessivi di mobilizzazione post-parto a sostegno di una produzione potenziale (K. L. Ingvarsen, 2006). Ottenere la condizione corporea raccomandata è relativamente facile nelle giovenche quando si somministrano i livelli energetici raccomandati. Tuttavia, nelle vacche da latte è un po' più complicato: l'alimentazione nel periodo di asciutta non può essere utilizzata per modificare sensibilmente la condizione corporea. In genere, le differenze tra la condizione corporea al momento dell'asciutta e quella al momento del parto sono minime, con una differenza di  $\pm 0,5$  unità per la maggior parte delle vacche (Markusfeld et al., 1997). A causa della durata limitata del periodo di asciutta (circa 7 settimane) e della ridotta capacità di assunzione durante la tarda gravidanza, è difficile modificare in modo marcato la condizione corporea con l'alimentazione, a meno che non si utilizzino diete estreme (K. L. Ingvarsen, 2006). La gestione delle vacche per ottenere il livello di condizione corporea desiderato al momento del parto dovrebbe essere presa in

considerazione all'inizio della lattazione precedente, in quanto le vacche potrebbero essere resistenti alla manipolazione dietetica delle loro riserve corporee nella parte finale della lattazione(K. L. Ingvarlsen, 2006). Un altro possibile metodo di monitoraggio del BCS prevede invece la misurazione dello spessore dello strato di grasso sottocutaneo del dorso, accumulato tra la cute e la fascia profonda del tronco, che si presenta come una linea bianca iperecogena agli ultrasuoni, dopo aver scontato 5-6 mm per il derma(Lei and Simões, 2021). La regione dell'osso sacro è il luogo d'elezione per questa misurazione perché è il punto in cui si raccoglie la più grande riserva di tessuto adiposo del dorso; per tale misurazione, si deve immaginare una linea orizzontale tra la tuberosità ischiatica e la tuberosità coxale e unire la quarta e la quinta parte caudale di tale linea, in verticale, fino alla giunzione dell'osso sacro con la prima vertebra caudale(Lei and Simões, 2021). Data l'elevata correlazione tra la quantità di grasso dorsale e il contenuto di grasso corporeo, possiamo valutare la condizione corporea di ogni animale a partire dalla prima. Sebbene questi due metodi sembrano pratici e semplici, la tendenza ad aumentare le dimensioni delle mandrie scoraggia i produttori dal monitorare regolarmente queste variabili, dato il tempo e la forza lavoro necessari(Gruber and Mansfeld, 2019).

### **4.2.3 Nutrizione**

Evitare una mobilitazione eccessiva nel periodo periparto è importante per prevenire patologie come la chetosi, legate all'alimentazione e alla gestione. Per mobilitazione eccessiva delle riserve corporee si intende una mobilitazione che supera quella normale nelle vacche gestite in modo da non essere compromesse da fattori ambientali. Le vacche in asciutta di solito iniziano a mobilitare il grasso corporeo verso la fine del periodo di asciutta e raggiungono un picco all'inizio della lattazione(K. L. Ingvarlsen, 2006). La concentrazione plasmatica di NEFA è correlata negativamente all'assunzione di sostanza secca e poiché il fabbisogno energetico per la gravidanza e lo sviluppo mammario aumenta, una maggiore densità di nutrienti può consentire di mantenere lo stesso apporto di nutrienti chiave nonostante un DMI (Dry Matter Intake) totale inferiore. Tale aumento della densità nutritiva nelle ultime 2-3 settimane prepartum, in genere aumentando il contenuto non fibroso della razione, è stato definito "steaming-up" o "dieta ravvicinata"(K. L. Ingvarlsen, 2006).

L'obiettivo è la massimizzazione dell'ingestione specialmente nelle ultime due settimane di gravidanza adottando alimenti non eccessivamente ricchi di fibra poco digeribile e comunque appetibili per il maggior numero di animali. Per quanto riguarda la capacità di assunzione all'inizio della lattazione, correlata negativamente con la concentrazione plasmatica di NEFA, potrebbe essere migliorata aumentando la capacità di assorbimento dei VFA (volatile fatty acids) nel rumine, riducendo così l'accumulo di VFA e aumentando il pH del rumine (K. L. Ingvarlsen, 2006). Una dieta a basso contenuto energetico nel periodo di asciutta può causare una degenerazione dell'epitelio del rumine e quindi una ridotta capacità di assorbimento dei VFA (K. L. Ingvarlsen, 2006). La somministrazione di un alto livello di concentrati nelle ultime 2 settimane prima del parto stimola la proliferazione dell'epitelio del rumine e aumenta l'area epiteliale durante i primi 1-2 mesi di lattazione. Il fattore più importante che stimola la crescita dell'epitelio è la concentrazione di VFA nel liquido del rumine, in particolare butirrato e propionato (K. L. Ingvarlsen, 2006; Kauffold et al., 1977). Tuttavia, stimolare l'epitelio del rumine aumentando i livelli di alimentazione durante il periodo di asciutta può avere effetti negativi sulla salute della peripartoriente a causa dell'aumento dell'ingrassamento al momento del parto, che dovrebbe essere evitato (K. L. Ingvarlsen, 2006).

In generale, l'assunzione di sostanza secca può essere aumentata incrementando la digeribilità della dieta e la velocità di passaggio. Per soddisfare l'aumentato fabbisogno di nutrienti per lo sviluppo del feto e la produzione di latte, alle vacche in transizione e a quelle in lattazione precoce vengono generalmente offerte diete composte da foraggio grezzo sminuzzato e quantità crescenti di carboidrati non fibrosi (K. L. Ingvarlsen, 2006).

La forma fisica della dieta è essenziale per mantenere un ambiente ruminale ottimale che garantisca la salute dell'animale. La mancanza di forma fisica riduce l'attività di masticazione, il riempimento ruminale, la motilità, la formazione di materassi di fibra e aumenta la concentrazione di VFA nel rumine (Shaver et al., 1986). Si dovrebbero evitare bruschi cambiamenti nella dieta, consentendo invece agli animali di variare gradualmente la dieta. La scarsa qualità dei mangimi, come gli insilati con elevati livelli di butirrato, deve essere evitata in quanto è legata a una scarsa capacità di assunzione e può aumentare i livelli di corpi chetonici e il rischio di chetosi nelle vacche peripartorienti (K. L. Ingvarlsen, 2006). Per

prevenire la carenza di carboidrati e quindi l'insorgenza della chetosi, dopo il parto e l'inizio della prima lattazione, si può somministrare alle vacche un precursore di carboidrati come il glicole propilenico con il pasto. Il propionato del glicole propilenico viene utilizzato per la gluconeogenesi e stimola la secrezione di insulina (Tufarelli et al., 2024). La somministrazione orale di PG (glicole propilenico) aumenta l'insulina del 200-400% entro 30 minuti dall'inizupamento. La somministrazione di PG aumenta anche il glucosio plasmatico, sebbene la risposta sia limitata, questo a causa del forte aumento dell'insulina (K. L. Ingvarlsen, 2006). Il PG riduce le concentrazioni plasmatiche di acidi grassi non esterificati e di  $\beta$ -idrossibutirrato, soprattutto nelle vacche in lattazione precoce con livelli relativamente elevati di NEFA. Il PG riduce anche il contenuto di triacilglicerolo nel fegato e le concentrazioni di corpi chetonici nel latte, e quindi ha proprietà anti-chetogeniche (K. L. Ingvarlsen, 2006). Il PG non ha alcun effetto sulla produzione di latte corretta per l'energia (ECM) e in generale non influisce sull'assunzione di mangime. Tuttavia, a causa della sua scarsa appetibilità, può ridurre l'assunzione di mangime se non viene mescolato accuratamente con altri componenti del mangime o se viene inzuppato. L'effetto di riduzione del PG sui NEFA, sulle concentrazioni di TG epatici e sul contenuto di grasso del latte indica che il PG migliora il bilancio energetico delle vacche all'inizio della lattazione (K. L. Ingvarlsen, 2006). Insieme alle proprietà anti-chetogeniche del PG, ciò suggerisce che il PG può ridurre il rischio di chetosi subclinica e clinica. Però il PG può presentare alcuni effetti collaterali, tra cui atassia, salivazione, iperventilazione e depressione. (K. L. Ingvarlsen, 2006).

Invece l'alimentazione proteica, soprattutto intesa a ottenere una determinata quantità di biomassa ruminale, deve essere apportatrice del tipo di proteina più equilibrata per la vacca da latte. Vandehaar ed altri ricercatori hanno osservato un miglioramento del DMI, una riduzione delle concentrazioni di NEFA nel siero e un migliore stato energetico nelle bovine alimentate con un piano elevato di proteine ed energia durante i 28 giorni prima del parto (Vandehaar et al., 1999). È stata osservata una riduzione della perdita del punteggio di condizione corporea e una riduzione dei tassi di chetosi nelle mucche pluripare e una migliore produzione di proteine del latte nelle mucche primipare alimentate con alti livelli di proteine non degradate provenienti da una fonte proteica animale di alta qualità prima

del parto(Gerloff, 2000). Molta attenzione va posta alla proteina della razione non dimenticando che la gluconeogenesi è il meccanismo biochimico preferenziale della bovina per produrre glucosio. È necessario che la concentrazione proteica della razione, intesa sia come azoto necessario a massimizzare la produzione di biomassa ruminale che, come proteina indegradabile nel rumine, sia adeguata come quantità che come qualità. La concentrazione del 12% di proteina, sulla sostanza secca della razione, nella fase centrale dell'asciutta e del 14% nel close-up sono ritenute, a tutt'oggi, funzionali agli obiettivi. Con la finalità di iniziare a stimolare la produzione pancreatica d'insulina è importante aumentare sia il livello di amidi che di proteina nelle ultime tre settimane di gestazione.

#### **4.2.4 Management**

Tra i fattori gestionali è importante ridurre lo stress legato al raggruppamento e allo spazio a disposizione(K. L. Ingvarlsen, 2006). È stato dimostrato che facendo alloggiare le giovenche in gruppi separati, c'è stato un incremento nell'assunzione di sostanza secca e nella produzione di latte, grazie alla riduzione dello stress sociale. Inoltre, il raggruppamento delle vacche da un gruppo all'altro può aumentare l'aggressività che può influire sul comportamento alimentare e sulle prestazioni delle vacche di basso rango in particolare, stress che potenzialmente può aumentare i rischi di malattia. Inoltre, deve essere disponibile uno spazio sufficiente per la cuccetta.(K. L. Ingvarlsen, 2006). Le strategie di gestione che aumentano l'aggressività tra gli animali dovrebbero essere evitate, non solo per i suoi effetti negativi sul comportamento alimentare e sull'assunzione, ma anche perché tale stress può potenzialmente aumentare la mobilitazione del grasso corporeo e quindi aumentare i rischi di malattia nelle vacche peripartorienti(K. L. Ingvarlsen, 2006). Lo stress ambientale, come lo stress da calore e umidità, deve essere prevenuto perché può avere effetti negativi sull'assunzione di sostanza secca, sul sistema immunitario, sulla salute, sulla riproduzione e sulla produzione(West, 2003). Per le vacche da latte, la temperatura critica superiore è di 25-26 °C, ma la temperatura critica superiore dipende probabilmente dallo stato fisiologico e da altre condizioni ambientali(K. L. Ingvarlsen, 2006). Si presume che le vacche da latte ad alto rendimento siano più a rischio di stress da calore rispetto a quelle a basso rendimento a causa di un'elevata correlazione tra la produzione di latte e l'incremento di calore(Kadzere

et al., 2002). Tuttavia, non è solo la temperatura a determinare la diminuzione dell'assunzione: anche l'umidità e la ventilazione modificano lo stress da calore (West et al., 2003). Lo stress da calore riduce leggermente l'assunzione di mangime a 25 °C, ma a temperature di 30 °C o superiori la riduzione è significativa. Lo stress da caldo o altri tipi di stress ambientale influenzano anche il sistema immunitario e potenzialmente il rischio di malattie (K. L. Ingvarlsen, 2006). Lo stress da calore può essere prevenuto attraverso l'ombra o il raffreddamento (ventilatore, spruzzatore, raffreddamento per evaporazione) delle vacche (West et al., 2003). Inoltre, lo stress da calore può essere ridotto dal punto di vista nutrizionale utilizzando ingredienti alimentari con un incremento termico relativamente basso, come i concentrati e i grassi. Tuttavia, la migliore densità energetica della dieta e il minore incremento termico associato all'inclusione di grassi nella dieta devono essere abbinati a limitazioni nella somministrazione di grassi per evitare disturbi ruminali e metabolici (K. L. Ingvarlsen, 2006).

## 5 CONCLUSIONI

---

In conclusione, la tesi esamina la grave problematica della chetosi che affligge le bovine da latte negli allevamenti intensivi. Nonostante siano noti i motivi di questa patologia, la sua prevenzione rimane estremamente difficile a causa della sua possibile manifestazione subclinica, priva di sintomi evidenti e tardi da rilevare. Il bilancio energetico negativo è inevitabile dal punto di vista fisiologico e porta a un complesso di disturbi interconnessi.

La situazione si è aggravata a causa della selezione genetica operata dall'uomo per massimizzare la produzione di latte e dei suoi componenti principali, premiando gli animali il cui utilizzo dei nutrienti per la mammella è ottimizzato a scapito di altre funzioni metaboliche. Per prevenire la chetosi nei soggetti allevati è essenziale agire su molteplici fronti, considerando che questa patologia, come molte altre condizioni biologiche, è influenzata dalla genetica, dall'ambiente, dalla nutrizione, dalla gestione e dalla sanità. Solo attraverso la prevenzione, il monitoraggio e la diagnosi precoce sarà possibile contrastare efficacemente questa patologia, il cui trattamento e le conseguenze possono comportare costi elevati per gli allevatori.

## 6 BIBLIOGRAFIA

---

- Baumgard, L. H., Collier, R. J., Bauman, D. E. (2017). A 100-Year Review: Regulation of nutrient partitioning to support lactation. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10353–10366. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13242>
- Baumgard, L., Schwartz, G., Kay, J., Rhoads, M. (2006). Does Negative Energy Balance (NEBAL) Limit Milk Synthesis in Early Lactation?
- 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>
- Benedet, A., Manuelian, C. L., Zidi, A., Penasa, M., Marchi, M. D. (2019). Invited review:  $\beta$ -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>
- Bewley, J. M., Schutz, M. M. (2008). An Interdisciplinary Review of Body Condition Scoring for Dairy Cattle. *The Professional Animal Scientist*, 24(6), 507–529. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30901-3](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30901-3)
- Bjerre-Harpøth, V., Storm, A. C., Eslamizad, M., Kuhla, B., Larsen, M. (2015). Effect of propylene glycol on adipose tissue mobilization in postpartum over-conditioned Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 8581–8596. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8606>

- 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)
- Bradford, B. J., Swartz, T. H. (2020). Review: Following the smoke signals: inflammatory signaling in metabolic homeostasis and homeorhesis in dairy cattle. *Animal*, *14*(S1), s144–s154. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003203>
- Bradford, B. J., Yuan, K., Farney, J. K., Mamedova, L. K., Carpenter, A. J. (2015). Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *Journal of Dairy Science*, *98*(10), 6631–6650. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9683>
- Brunner, N., Groeger, S., Canelas Raposo, J., Bruckmaier, R. M., Gross, J. J. (2019). Prevalence of subclinical ketosis and production diseases in dairy cows in Central and South America, Africa, Asia, Australia, New Zealand, and Eastern Europe<sup>1</sup>. *Translational Animal Science*, *3*(1), 84–92. <https://doi.org/10.1093/tas/txy102>
- 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>
- Capper, J. L., Cady, R. A., Bauman, D. E. (2009). The environmental impact of dairy production: 1944 compared with 2007<sup>1</sup>. *Journal of Animal Science*, *87*(6), 2160–2167. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-1781>
- Cascone, G., Licitra, F., Stamilla, A., Amore, S., Dipasquale, M., Salonia, R., ... Zecconi, A. (2022). Subclinical Ketosis in Dairy Herds: Impact of Early Diagnosis and Treatment. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.895468>

- Constable, P. D., Hinchcliff, K. W., Done, S. H., Gruenberg, W. (2016). *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. Elsevier Health Sciences.
- 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>
- Coppock, C. E. (1985). Energy Nutrition and Metabolism of the Lactating Dairy Cow1. *Journal of Dairy Science*, 68(12), 3403–3410. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)81253-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81253-4)
- Cotter, D. G., Ercal, B., Huang, X., Leid, J. M., d’Avignon, D. A., Graham, M. J., ... Crawford, P. A. (2014). Ketogenesis prevents diet-induced fatty liver injury and hyperglycemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(12), 5175–5190. <https://doi.org/10.1172/JCI76388>
- Dar, A., Malik, H., Beigh, S., Hussain, S., Nabi, S., Dar, A., ... Bhat, A. (2018). Clinico-biochemical alternation in bovine ketosis. *Journal of Entomology and Zoology Studies*.
- Daros, R. R., Weary, D. M., Keyserlingk, M. A. G. von. (2022). Invited review: Risk factors for transition period disease in intensive grazing and housed dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 105(6), 4734–4748. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20649>
- David Baird, G. (1982). Primary Ketosis in the High-Producing Dairy Cow: Clinical and Subclinical Disorders, Treatment, Prevention, and Outlook. *Journal of Dairy Science*, 65(1), 1–10. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82146-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82146-2)
- De Boer, G., Trenkle, A., Young, J. W. (1985). Glucagon, Insulin, Growth Hormone, and Some Blood Metabolites During Energy Restriction Ketonemia of Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*, 68(2), 326–337. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80829-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80829-8)
- De Koster, J. D., Opsomer, G. (2013). Insulin Resistance in Dairy Cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29(2), 299–322. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.04.002>

- de Roos, A. P. W., van den Bijgaart, H. J. C. M., Hørlyk, J., de Jong, G. (2007). Screening for Subclinical Ketosis in Dairy Cattle by Fourier Transform Infrared Spectrometry. *Journal of Dairy Science*, *90*(4), 1761–1766. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-203>
- Dohoo, I. R., Martin, S. W. (1984). Subclinical ketosis: prevalence and associations with production and disease. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, *48*(1), 1–5.
- 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., Dann, H. M., Douglas, N., Guretzky, N. A. J., Litherland, N. B., Underwood, J. P., Loor, J. J. (2005). Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Italian Journal of Animal Science*, *4*(4), 323–344. <https://doi.org/10.4081/ijas.2005.323>
- Drackley, J. K., Overton, T. R., Douglas, G. N. (2001). Adaptations of Glucose and Long-Chain Fatty Acid Metabolism in Liver of Dairy Cows during the Periparturient Period. *Journal of Dairy Science*, *84*, E100–E112. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70204-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70204-4)
- Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., LeBlanc, S. J. (2010). Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *93*(12), 5764–5771. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3429>
- Duffield, T. F., Lissemore, K. D., McBride, B. W., Leslie, K. E. (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science*, *92*(2), 571–580. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1507>
- E. Block. (2010). Transition Cow Research – What Makes Sense Today?
- Elmhadi, M. E., Ali, D. K., Khogali, M. K., Wang, H. (2022). Subacute ruminal acidosis in dairy herds: Microbiological and nutritional causes, consequences, and prevention strategies. *Animal Nutrition*, *10*, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.12.008>

- Enemark, J. M. D. (2008). The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. *The Veterinary Journal*, 176(1), 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.021>
- Engelking, L. (2010). *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry, Updated 2/e*. Academic Press.
- Esposito, G., Irons, P. C., Webb, E. C., Chapwanya, A. (2014). Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 144(3), 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.11.007>
- Ferraro, S. M., Mendoza, G. D., Miranda, L. A., Gutiérrez, C. G. (2009). *In vitro* gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses. *Animal Feed Science and Technology*, 154(1), 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.07.009>
- Fukao, T., Mitchell, G., Sass, J. O., Hori, T., Orii, K., Aoyama, Y. (2014). Ketone body metabolism and its defects. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(4), 541–551. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9704-9>
- García, A. M. B., Cardoso, F. C., Campos, R., Thedy, D. X., González, F. H. D. (2011). Metabolic evaluation of dairy cows submitted to three different strategies to decrease the effects of negative energy balance in early postpartum. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31, 11–17. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011001300003>
- Gerloff, B. J. (2000). Dry Cow Management for the Prevention of Ketosis and Fatty Liver in Dairy Cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(2), 283–292. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30106-7](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30106-7)
- Gillund, P., Reksen, O., Gröhn, Y. T., Karlberg, K. (2001). Body Condition Related to Ketosis and Reproductive Performance in Norwegian Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 84(6), 1390–1396. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70170-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70170-1)

- Gohary, K., Overton, M. W., Von Massow, M., LeBlanc, S. J., Lissemore, K. D., Duffield, T. F. (2016). The cost of a case of subclinical ketosis in Canadian dairy herds. *The Canadian Veterinary Journal*, 57(7), 728–732.
- 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>
- Gozho, G. N., Krause, D. O., Plaizier, J. C. (2007). Ruminal Lipopolysaccharide Concentration and Inflammatory Response During Grain-Induced Subacute Ruminal Acidosis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 856–866. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71569-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71569-2)
- Green, M. J., Green, L. E., Medley, G. F., Schukken, Y. H., Bradley, A. J. (2002). Influence of Dry Period Bacterial Intramammary Infection on Clinical Mastitis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2589–2599. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74343-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74343-9)
- Gröhn, Y. T., Erb, H. N., McCulloch, C. E., Saloniemi, H. S. (1989). Epidemiology of Metabolic Disorders in Dairy Cattle: Association Among Host Characteristics, Disease, and Production. *Journal of Dairy Science*, 72(7), 1876–1885. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79306-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79306-1)
- Gross, J. J., Bruckmaier, R. M. (2019). *Invited review*: Metabolic challenges and adaptation during different functional stages of the mammary gland in dairy cows: Perspectives for sustainable milk production. *Journal of Dairy Science*, 102(4), 2828–2843. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15713>
- 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>

Gross, J., van Dorland, H. A., Bruckmaier, R. M., Schwarz, F. J. (2011a). Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. *Journal of Dairy Science*, 94(4), 1820–1830. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3707>

Gross, J., van Dorland, H. A., Bruckmaier, R. M., Schwarz, F. J. (2011b). Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. *Journal of Dairy Science*, 94(4), 1820–1830. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3707>

Gross, Josef J. (2023). Hepatic Lipidosis in Ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 39(2), 371–383. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2023.02.007>

Gruber, S., Mansfeld, R. (2019). Herd health monitoring in dairy farms – discover metabolic diseases. An overview. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere / Nutztiere*, 47(4), 246–255. <https://doi.org/10.1055/a-0949-1637>

Gruffat, D., Durand, D., Graulet, B., Bauchart, D. (1996). Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver. *Reproduction Nutrition Development*, 36(4), 375–389. <https://doi.org/10.1051/rnd:19960404>

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)

Grummer, R. R., Mashek, D. G., Hayirli, A. (2004). Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20(3), 447–470. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.013>

- Guliński, P. (2021). Ketone bodies – causes and effects of their increased presence in cows' body fluids: A review. *Veterinary World*, 14(6), 1492–1503. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1492-1503>
- Hayirli, A. (2006). The Role of Exogenous Insulin in the Complex of Hepatic Lipidosis and Ketosis Associated with Insulin Resistance Phenomenon in Postpartum Dairy Cattle. *Veterinary Research Communications*, 30(7), 749–774. <https://doi.org/10.1007/s11259-006-3320-6>
- Hayirli, A., Grummer, R. R. (2004). Factors affecting dry matter intake prepartum in relationship to etiology of peripartum lipid-related metabolic disorders: A review. *Canadian Journal of Animal Science*, 84(3), 337–347. <https://doi.org/10.4141/A03-122>
- Hayirli, A., Grummer, R. R., Nordheim, E. V., Crump, P. M. (2002). Animal and Dietary Factors Affecting Feed Intake During the Prefresh Transition Period in Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 85(12), 3430–3443. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74431-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74431-7)
- Herd, T. H., Wensing, T., Haagsman, H. P., van Golde, L. M. G., Breukink, H. J. (1988). Hepatic Triacylglycerol Synthesis during a Period of Fatty Liver Development in Sheep. *Journal of Animal Science*, 66(8), 1997–2013. <https://doi.org/10.2527/jas1988.6681997x>
- Herd, Thomas H. (2000). Ruminant Adaptation to Negative Energy Balance: Influences on the Etiology of Ketosis and Fatty Liver. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(2), 215–230. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30102-X](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30102-X)
- Herd, Thomas H., Emery, R. S. (1992). Therapy of Diseases of Ruminant Intermediary Metabolism. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 8(1), 91–106. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30761-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30761-1)
- Heuwieser, W., Falkenberg, U., Iwersen, M., Voigtsberger, R., Padberg, W. (2007). Evaluation and Use of an Automated Human  $\beta$ -hydroxybuturate (BHBA) Test for Cowside Detection of

Subclinical Ketosis in Dairy Cattle. *American Association of Bovine Practitioners Conference Proceedings*, 253–254. <https://doi.org/10.21423/aabppro20074606>

Ingvartsen, K. L. (2006). Feeding- and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science and Technology*, 126(3), 175–213. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.003>

Ingvartsen, K. L., Andersen, J. B. (2000). Integration of Metabolism and Intake Regulation: A Review Focusing on Periparturient Animals. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1573–1597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75029-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75029-6)

Ingvartsen, K. L., Dewhurst, R. J., Friggens, N. C. (2003). On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science*, 83(2), 277–308. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(03\)00110-6](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(03)00110-6)

Ingvartsen, K. L., Moyes, K. (2013). Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal*, 7(s1), 112–122. <https://doi.org/10.1017/S175173111200170X>

Ingvartsen, Klaus L., Moyes, K. M. (2015a). Factors contributing to immunosuppression in the dairy cow during the periparturient period. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 63(Supplement 1), S15–S24.

Ingvartsen, Klaus L., Moyes, K. M. (2015b, February). Factors contributing to immunosuppression in the dairy cow during the periparturient period. Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University. <https://doi.org/10.14943/jjvr.63.suppl.s15>

Iwersen, M., Falkenberg, U., Voigtsberger, R., Forderung, D., Heuwieser, W. (2009). Evaluation of an electronic cowside test to detect subclinical ketosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2618–2624. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1795>

- Jaramillo-López, E., Itza-Ortiz, M. F., Peraza-Mercado, G., Carrera-Chávez, J. M., Jaramillo-López, E., Itza-Ortiz, M. F., ... Carrera-Chávez, J. M. (2017). Ruminal acidosis: strategies for its control. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, *49*(3), 139–148. <https://doi.org/10.4067/S0719-81322017000300139>
- Jenkins, N. T., Peña, G., Risco, C., Barbosa, C. C., Vieira-Neto, A., Galvão, K. N. (2015). Utility of inline milk fat and protein ratio to diagnose subclinical ketosis and to assign propylene glycol treatment in lactating dairy cows. *The Canadian Veterinary Journal*, *56*(8), 850–854.
- Jimmy L. Howard. (1981). Ruminal metabolic acidosis | The Bovine Practitioner. Retrieved March 28, 2024, from <https://bovine-ojs-tamu.tdl.org/bovine/article/view/1967>
- Jordaens, L., Van Hoeck, V., De Bie, J., Berth, M., Marei, W. F. A., Desmet, K. L. J., ... Leroy, J. L. M. R. (2017). Non-esterified fatty acids in early luteal bovine oviduct fluid mirror plasma concentrations: An *ex vivo* approach. *Reproductive Biology*, *17*(3), 281–284. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.05.009>
- Jorritsma, R., Wensing, T., Kruij, T., Vos, P., Noordhuizen, J. (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>
- Kadzere, C. T., Murphy, M. R., Silanikove, N., Maltz, E. (2002). Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science*, *77*(1), 59–91. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(01\)00330-X](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00330-X)
- Kauffold, P., Voigt, J., Herrendörfer, G. (1977). [The effect of nutritional factors on the ruminal mucosa. 3. Condition of the mucosa after infusion of propionic acid, acetic acid and butyric acid]. *Archiv fur Tierernahrung*, *27*(3), 201–211. <https://doi.org/10.1080/17450397709424571>

- Kaufman, E. I., LeBlanc, S. J., McBride, B. W., Duffield, T. F., DeVries, T. J. (2016). Association of rumination time with subclinical ketosis in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *99*(7), 5604–5618. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10509>
- Kauppinen, K. (1983). Prevalence of Bovine Ketosis in Relation to Number and Stage of Lactation. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *24*(4), 349–361. <https://doi.org/10.1186/BF03546709>
- Kehrli, M., Ridpath, J., Neill, J. (2009). Immune suppression in cattle: Contributors and consequences. *NMC Annual Meeting Proceedings*.
- King, M. T. M., Duffield, T. F., DeVries, T. J. (2019). *Short communication*: Assessing the accuracy of inline milk fat-to-protein ratio data as an indicator of hyperketonemia in dairy cows in herds with automated milking systems. *Journal of Dairy Science*, *102*(9), 8417–8422. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16070>
- Krempaský, M., Maskařová, I., Bujňák, L., Vajda, V. (2014). Ketone bodies in blood of dairy cows: Prevalence and monitoring of subclinical ketosis. *Acta Veterinaria Brno*, *83*(4), 411–416. <https://doi.org/10.2754/avb201483040411>
- Kvidera, S. K., Horst, E. A., Abuajamieh, M., Mayorga, E. J., Fernandez, M. V. S., Baumgard, L. H. (2017). Glucose requirements of an activated immune system in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, *100*(3), 2360–2374. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12001>
- Laffel, L. (1999). Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, *15*(6), 412–426. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-7560\(199911/12\)15:6<412::AID-DMRR72>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-7560(199911/12)15:6<412::AID-DMRR72>3.0.CO;2-8)
- Larsen, T., Nielsen, N. I. (2005). Fluorometric Determination of  $\beta$ -Hydroxybutyrate in Milk and Blood Plasma. *Journal of Dairy Science*, *88*(6), 2004–2009. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72876-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72876-9)

- 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>
- LeBlanc, S. J. (2020). Review: Relationships between metabolism and neutrophil function in dairy cows in the peripartum period. *Animal*, 14(S1), s44–s54. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003227>
- Leese, H. J., Baumann, C. G., Brison, D. R., McEvoy, T. G., Sturmey, R. G. (2008). Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Molecular Human Reproduction*, 14(12), 667–672. <https://doi.org/10.1093/molehr/gan065>
- Lei, M. A. C., Simões, J. (2021). Invited Review: Ketosis Diagnosis and Monitoring in High-Producing Dairy Cows. *Dairy*, 2(2), 303–325. <https://doi.org/10.3390/dairy2020025>
- Liang, D., Arnold, L. M., Stowe, C. J., Harmon, R. J., Bewley, J. M. (2017). Estimating US dairy clinical disease costs with a stochastic simulation model. *Journal of Dairy Science*, 100(2), 1472–1486. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11565>
- Mann, S., Yepes, F. A. L., Overton, T. R., Wakshlag, J. J., Lock, A. L., Ryan, C. M., Nydam, D. V. (2015). Dry period plane of energy: Effects on feed intake, energy balance, milk production, and composition in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(5), 3366–3382. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9024>
- Markusfeld, O., Galon, N., Ezra, E. (1997). Body condition score, health, yield and fertility in dairy cows. *Veterinary Record*, 141(3), 67–72. <https://doi.org/10.1136/vr.141.3.67>
- McArt, J. A. A., Nydam, D. V., Oetzel, G. R. (2012a). A field trial on the effect of propylene glycol on displaced abomasum, removal from herd, and reproduction in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science*, 95(5), 2505–2512. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4908>

- McArt, J. A. A., Nydam, D. V., Oetzel, G. R. (2012b). Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 5056–5066. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5443>
- 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>
- McArt, J. A. A., Nydam, D. V., Overton, M. W. (2015). Hyperketonemia in early lactation dairy cattle: A deterministic estimate of component and total cost per case. *Journal of Dairy Science*, 98(3), 2043–2054. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8740>
- Mekuriaw, Y. (2023). Negative energy balance and its implication on productive and reproductive performance of early lactating dairy cows: review paper. *Journal of Applied Animal Research*, 51(1), 220–229. <https://doi.org/10.1080/09712119.2023.2176859>
- Mooli, R. G. R., Ramakrishnan, S. K. (2022). Emerging Role of Hepatic Ketogenesis in Fatty Liver Disease. *Frontiers in Physiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.946474>
- Mostert, P. F., Bokkers, E. a. M., Middelaar, C. E. van, Hogeveen, H., Boer, I. J. M. de. (2018). Estimating the economic impact of subclinical ketosis in dairy cattle using a dynamic stochastic simulation model. *Animal*, 12(1), 145–154. <https://doi.org/10.1017/S1751731117001306>
- 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>
- Nielen, M., Aarts, M. G., Jonkers, A. G., Wensing, T., Schukken, Y. H. (1994). Evaluation of two cowside tests for the detection of subclinical ketosis in dairy cows. *The Canadian Veterinary Journal*, 35(4), 229–232.

- Nielsen, N. I., Ingvarsten, K. L. (2004). Propylene glycol for dairy cows: A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. *Animal Feed Science and Technology*, 115(3), 191–213. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.03.008>
- Oetzel, G. R. (2004). Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 20(3), 651–674. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.006>
- Oetzel, G. R. (2015). Herd-Level Ketosis – Diagnosis and Risk Factors.
- Overton, T. R., McArt, J. A. A., Nydam, D. V. (2017). A 100-Year Review: Metabolic health indicators and management of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10398–10417. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13054>
- Paape, M., Mehrzad, J., Zhao, X., Detilleux, J., Burvenich, C. (2002). Defense of the Bovine Mammary Gland by Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(2), 109–121. <https://doi.org/10.1023/A:1020343717817>
- Pascottini, O. B., Leroy, J. L. M. R., Opsomer, G. (2022). Maladaptation to the transition period and consequences on fertility of dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(S4), 21–32. <https://doi.org/10.1111/rda.14176>
- 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>
- Plaizier, J. C., Krause, D. O., Gozho, G. N., McBride, B. W. (2008). Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *The Veterinary Journal*, 176(1), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.016>

- Puchalska, P., Crawford, P. A. (2017). Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metabolism*, 25(2), 262–284. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.022>
- Raboisson, D., Mounié, M., Khenifar, E., Maigné, E. (2015). The economic impact of subclinical ketosis at the farm level: Tackling the challenge of over-estimation due to multiple interactions. *Preventive Veterinary Medicine*, 122(4), 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.07.010>
- Redfern, E. A., Sinclair, L. A., Robinson, P. A. (2021). Dairy cow health and management in the transition period: The need to understand the human dimension. *Research in Veterinary Science*, 137, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.04.029>
- Reynolds, C. K., Aikman, P. C., Lupoli, B., Humphries, D. J., Beever, D. E. (2003). Splanchnic Metabolism of Dairy Cows During the Transition From Late Gestation Through Early Lactation. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1201–1217. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73704-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73704-7)
- Richieri, G. V., Kleinfeld, A. M. (1995). Unbound free fatty acid levels in human serum. *Journal of Lipid Research*, 36(2), 229–240. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)39899-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39899-0)
- Rico, J. E., Barrientos-Blanco, M. A. (2024). INVITED REVIEW: Ketone biology: the shifting paradigm of ketones and ketosis in the dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 0(0). <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23904>
- Rizos, D., Kenny, D. A., Griffin, W., Quinn, K. M., Duffy, P., Mulligan, F. J., ... Lonergan, P. (2008). The effect of feeding propylene glycol to dairy cows during the early postpartum period on follicular dynamics and on metabolic parameters related to fertility. *Theriogenology*, 69(6), 688–699. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.001>

- 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>
- Roche, John R., Kay, J. K., Friggens, N. C., Looor, J. J., Berry, D. P. (2013). Assessing and Managing Body Condition Score for the Prevention of Metabolic Disease in Dairy Cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29(2), 323–336. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.003>
- Ronald Kahn, C. (1978). Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: A necessary distinction. *Metabolism*, 27(12, Supplement 2), 1893–1902. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(78\)80007-9](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(78)80007-9)
- Sakai, T., Hayakawa, T., Hamakawa, M., Ogura, K., Kubo, S. (1993). Therapeutic Effects of Simultaneous Use of Glucose and Insulin in Ketotic Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 76(1), 109–114. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77329-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77329-4)
- Satoła, A., Bauer, E. A. (2021). Predicting Subclinical Ketosis in Dairy Cows Using Machine Learning Techniques. *Animals*, 11(7), 2131. <https://doi.org/10.3390/ani11072131>
- Schirmann, K., Weary, D. M., Heuwieser, W., Chapinal, N., Cerri, R. L. A., von Keyserlingk, M. A. G. (2016). *Short communication: Ruminantion and feeding behaviors differ between healthy and sick dairy cows during the transition period. Journal of Dairy Science*, 99(12), 9917–9924. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10548>
- Schmitz, R., Schnabel, K., Frahm, J., von Soosten, D., Meyer, U., Hüther, L., ... Dänicke, S. (2021). Effects of Energy Supply from Roughage and Concentrates and the Occurrence of Subclinical Ketosis on Blood Chemistry and Liver Health in Lactating Dairy Cows during Early Lactation. *Dairy*, 2(1), 25–39. <https://doi.org/10.3390/dairy2010003>

- Seifi, H. A., LeBlanc, S. J., Leslie, K. E., Duffield, T. F. (2011). Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, 188(2), 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.007>
- Service F.J. (1995). Hypoglycemic Disorders. *New England Journal of Medicine*, 332(17), 1144–1152. <https://doi.org/10.1056/NEJM199504273321707>
- Shaver, R. D., Nytes, A. J., Satter, L. D., Jorgensen, N. A. (1986). Influence of Amount of Feed Intake and Forage Physical Form on Digestion and Passage of Prebloom Alfalfa Hay in Dairy Cows<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science*, 69(6), 1545–1559. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80571-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80571-9)
- Sheldon, I. M., Williams, E. J., Miller, A. N. A., Nash, D. M., Herath, S. (2008). Uterine diseases in cattle after parturition. *The Veterinary Journal*, 176(1), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.031>
- Shepherd, P. R., Kahn, B. B. (1999). Glucose Transporters and Insulin Action — Implications for Insulin Resistance and Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine*, 341(4), 248–257. <https://doi.org/10.1056/NEJM199907223410406>
- Sordillo, L. M., Raphael, W. (2013). Significance of Metabolic Stress, Lipid Mobilization, and Inflammation on Transition Cow Disorders. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 29(2), 267–278. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.002>
- Steenefeld, W., Amuta, P., van Soest, F. J. S., Jorritsma, R., Hogeveen, H. (2020). Estimating the combined costs of clinical and subclinical ketosis in dairy cows. *PLoS ONE*, 15(4), e0230448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230448>
- Stoop, W. M., Bovenhuis, H., Heck, J. M. L., van Arendonk, J. A. M. (2009). Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1469–1478. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1468>

- Suriyasathaporn, W., Heuer, C., Noordhuizen-Stassen, E., Schukken, Y. (2000). Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. *Veterinary Research*, 31(4), 397–412. <https://doi.org/10.1051/vetres:2000128>
- Suthar, V. S., Canelas-Raposo, J., Deniz, A., Heuwieser, W. (2013). Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 2925–2938. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6035>
- Tehrani-Sharif, M., Hadadi, M., Noughabi, H. H., Mohammadi, A., Rostami, F., Sharifi, H. (2012). Bovine subclinical ketosis in dairy herds in Nishaboor, Iran. *Comparative Clinical Pathology*, 21(6), 1637–1641. <https://doi.org/10.1007/s00580-011-1340-2>
- Tufarelli, V., Puvača, N., Glamočić, D., Pugliese, G., Colonna, M. A. (2024). The Most Important Metabolic Diseases in Dairy Cattle during the Transition Period. *Animals*, 14(5), 816. <https://doi.org/10.3390/ani14050816>
- Vandehaar, M. J., Yousif, G., Sharma, B. K., Herdt, T. H., Emery, R. S., Allen, M. S., Liesman, J. S. (1999). Effect of Energy and Protein Density of Prepartum Diets on Fat and Protein Metabolism of Dairy Cattle in the Periparturient Period<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science*, 82(6), 1282–1295. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75351-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75351-8)
- Veerkamp, R. F. (1998). Selection for Economic Efficiency of Dairy Cattle Using Information on Live Weight and Feed Intake: A Review. *Journal of Dairy Science*, 81(4), 1109–1119. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75673-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75673-5)
- West, J. W. (2003). Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 86(6), 2131–2144. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73803-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73803-X)
- West, J. W., Mullinix, B. G., Bernard, J. K. (2003). Effects of Hot, Humid Weather on Milk Temperature, Dry Matter Intake, and Milk Yield of Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 232–242. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73602-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73602-9)

- Wilcox, G. (2005). Insulin and Insulin Resistance. *Clinical Biochemist Reviews*, 26(2), 19–39.
- Wu, G. (2020). Chapter 27 - Management of metabolic disorders (including metabolic diseases) in ruminant and nonruminant animals. In F. W. Bazer, G. C. Lamb, & G. Wu (Eds.), *Animal Agriculture* (pp. 471–491). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817052-6.00027-6>
- Youssef, M., El-Ashker, M. (2017). Significance of insulin resistance and oxidative stress in dairy cattle with subclinical ketosis during the transition period. *Tropical Animal Health and Production*, 49(2), 239–244. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1211-6>
- Zhang, F., Nan, X., Wang, H., Zhao, Y., Guo, Y., Xiong, B. (2020). Effects of Propylene Glycol on Negative Energy Balance of Postpartum Dairy Cows. *Animals*, 10(9), 1526. <https://doi.org/10.3390/ani10091526>
- 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>
- Zhang, G., Hailemariam, D., Dervishi, E., Deng, Q., Goldansaz, S. A., Dunn, S. M., Ametaj, B. N. (2015). Alterations of Innate Immunity Reactants in Transition Dairy Cows before Clinical Signs of Lameness. *Animals*, 5(3), 717–747. <https://doi.org/10.3390/ani5030381>
- Zhang, M., Zhang, S., Hui, Q., Lei, L., Du, X., Gao, W., ... Li, X. (2015).  $\beta$ -Hydroxybutyrate Facilitates Fatty Acids Synthesis Mediated by Sterol Regulatory Element-Binding Protein1 in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(6), 2115–2124. <https://doi.org/10.1159/000438569>

