



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

**ATTITUDINE PRODUTTIVA E RAZZA BOVINA QUALI
ELEMENTI INFLUENZANTI IL TRASFERIMENTO DI
IMMUNITÀ PASSIVA COLOSTRALE NEL VITELLO**

**BOVINE'S BREED AND PRODUCTIVE ATTITUDE AS
FACTORS INFLUENCING THE PASSIVE TRANSFER OF
COLOSTRAL IMMUNOGLOBULINS IN CALVES**

Relatore: *Chiar.mo Prof.* SANDRO CAVIRANI

Correlatore: *Dott.ssa.* EMILIANA SCHIANO

Laureando:

CORRADO GAMBETTI

ANNO ACCADEMICO: 2020-2021

INDICE

ABSTRACT	
INTRODUZIONE	1
1 L'IMMUNITÀ DEI RUMINANTI NEONATI	1
2 IL COLOSTRO	4
2.1 <i>Composizione del colostro</i>	4
2.1.1 Le immunoglobuline	5
2.1.2 Leucociti materni	12
2.1.3 Fattori antimicrobici	12
2.1.4 Citochine e fattori di crescita	13
2.1.5 Nutrienti	14
2.2 <i>Qualità del colostro e come valutarla</i>	16
2.3 <i>Fattori influenzanti la qualità del colostro.</i>	19
2.3.1 Numero di lattazioni sostenute ed età della bovina	19
2.3.2 Genetica: razza, attitudine produttiva e volume di colostro prodotto	20
2.3.3 Prima mungitura dal parto	21
2.3.4 Periodo di asciutta	21
2.3.5 Stagione del parto	23
2.3.6 Stato sanitario della bovina e mastiti	23
2.3.7 Vaccinazioni	24
2.4 <i>Gestione del colostro dopo la mungitura</i>	26
3 FISILOGIA DELLA DIGESTIONE NEL VITELLO PRE-RUMINANTE	28
4 ASSORBIMENTO DELLE IMMUNOGLOBULINE A LIVELLO INTESTINALE	30
5 FATTORI INFLUENZANTI IL TRASFERIMENTO DELL'IMMUNITÀ PASSIVA COLOSTRALE	33
5.1 <i>Tempistica di somministrazione del colostro</i>	34
5.2 <i>Quantità di colostro somministrato</i>	37
5.3 <i>Modalità di somministrazione del colostro</i>	39
5.4 <i>Stress</i>	41
5.4.1 Stress da freddo	41
5.4.2 Parti distocici	41
5.5 <i>Dismicrobismi intestinali</i>	42
6 FPT, PATOLOGIE NEONATALI NEL VITELLO E RICADUTE SULLE PRODUZIONI	44
6.1 <i>Diarree neonatali su base infettiva e polmoniti</i>	46
6.2 <i>Diarrea alimentare</i>	48
6.3 <i>Ricadute sulle produzioni e profilassi</i>	49
7 TRASFERIMENTO PASSIVO ARTIFICIALE	50
8 COME VALUTARE IL TRASFERIMENTO DI IMMUNITÀ PASSIVA	53
8.1 <i>Immunodiffusione radiale (RID)</i>	54

Indice

8.2	<i>Tecnica immunoturbidimetrica (TIA)</i>	55
8.3	<i>ELISA</i>	55
8.4	<i>Immunomigrazione rapida o test a flusso laterale</i>	56
8.5	<i>Elettroforesi</i>	57
8.6	<i>Rifrattometro</i>	57
8.7	<i>Attività della GGT sierica</i>	59
8.8	<i>Test di coagulazione con glutaraldeide</i>	59
8.9	<i>Test di torbidità con solfato di zinco</i>	60
8.10	<i>Test di precipitazione in sodio solfito</i>	62
9	RAZZE BOVINE	65
9.1	<i>Frisona Italiana</i>	66
9.2	<i>Reggiana</i>	68
9.3	<i>Bianca Modenese</i>	70
9.4	<i>Piemontese</i>	72
9.5	<i>Correlazioni genetiche fra le razze e consanguineità</i>	74
10	SCOPO DELLA TESI	76
	MATERIALI E METODI	77
11	ALLEVAMENTI OGGETTO DELLO STUDIO	79
12	RACCOLTA E GESTIONE DEL MATERIALE BIOLOGICO	83
13	ANALISI DI LABORATORIO DEL SIERO MEDIANTE TEST DI PRECIPITAZIONE IN SODIO SOLFITO	87
13.1	<i>Preparazione della soluzione test di sodio solfito</i>	87
13.2	<i>Analisi dei campioni e interpretazione della prova di precipitazione</i>	90
14	ANALISI DEL COLOSTRO MEDIANTE RIFRATTOMETRO	94
	RISULTATI	96
15	RISULTATI DEL TEST DI PRECIPITAZIONE IN SODIO SOLFITO SUI SIERI DEI VITELLI	96
15.1	<i>Razza Frisona Italiana</i>	101
15.2	<i>Razza Reggiana</i>	102
15.3	<i>Razza Bianca Modenese</i>	103
15.4	<i>Razza Piemontese</i>	104
16	RISULTATI DELL'ANALISI RIFRATTOMETRICA DEI COLOSTRI	105
	DISCUSSIONE	106
	CONCLUSIONI	124
	BIBLIOGRAFIA	131

ABSTRACT

Il presente studio è durato quasi 2 anni e ha riguardato quattro diverse razze bovine (*Bos taurus*): Frisona Italiana, Reggiana, Bianca Modenese e Piemontese. Lo scopo era di capire se, e in che misura, l'attitudine produttiva delle bovine potesse influire sul trasferimento passivo anticorpale nei vitelli. Allo studio hanno partecipato quattordici aziende, che sono state selezionate in virtù delle corrette pratiche di gestione dei vitelli appena nati. Sulla base di alcune evidenze si può affermare di aver eliminato, per quanto possibile, fattori esterni, non derivanti dalla razza bovina, in grado di influire sull'immunizzazione passiva dei vitelli.

Sono stati effettuati prelievi di sangue esclusivamente dai vitelli di età compresa fra i 3 e i 10 giorni di vita, così da essere certi che gli anticorpi circolanti fossero di derivazione materna. Per valutare i titoli anticorpali dei vitelli si sono analizzati i sieri ematici mediante test di precipitazione in sodio solfito, seguendo le procedure descritte in letteratura. In totale si sono esaminati 127 campioni di emosiero: 41 di Frisona Italiana, 32 di Reggiana, 29 di Bianca Modenese e 27 di Piemontese.

Terminate le analisi di laboratorio abbiamo inserito i dati ottenuti in Excel e calcolato, per ciascuna razza, distribuzione, media e intervallo fiduciale, con un livello di confidenza del 95%. Gli esiti delle quattro razze bovine sono stati poi confrontati mediante test t di Student per evidenziare se vi fossero delle differenze statisticamente significative; il livello di significatività adottato è del 5% ($\alpha = 0,05$). La significatività statistica è stata raggiunta in tutti i confronti fra le razze, tranne per quello fra Piemontese e Reggiana.

Si sono prelevati anche 10 campioni di colostro, provenienti dalle bovine di tre delle quattro razze oggetto dello studio. Questi sono stati analizzati direttamente in azienda mediante rifrattometro a compensazione automatica della temperatura. Sebbene il ridotto campionamento non permetta di fare valutazioni statistiche in merito ai colostri, riportiamo i risultati, poiché ci hanno orientati nel formulare alcune ipotesi che possono spiegare quanto è emerso dalle analisi dei sieri.

In virtù dei risultati ottenuti dal test di precipitazioni in sodio solfito, nonché dei dati statistici elaborati, si può affermare che la forte spinta per la produzione lattea abbia portato ad avere problematiche di trasferimento anticorpale nei vitelli. Con i dati attuali è più difficile, invece, dare una spiegazione a quanto osservato dai raffronti fra le due razze “duplice attitudine” (Reggiana e Bianca Modenese) con quella “da carne” (Piemontese).

Al termine dell’elaborato viene discusso quanto osservato, confrontandolo con i diversi articoli analizzati, inerenti il trasferimento di immunità passiva colostrale. Abbiamo modo di accreditare ipotesi già esistenti e ne formuliamo di nuove, che possono spiegare in che modo l’attitudine lattifera delle bovine, in primis, ma anche altri fattori, penalizzino il trasferimento passivo anticorpale nei vitelli.

This study lasted almost 2 years and it was about 4 different bovine races: Frisone italiana, Bianca modenese, Reggiana and Piemontese. The main purpose was understanding, if and how, the productive aptitude of bovines would affect calves' passive antibody transfer. This project involved 14 farms, which have been chosen thanks to their capability of correct management of newborn calves. Based upon scientific facts, we can consider as deleted some external influences which are able to influence calf's passive immunisation.

Blood samples were carried out on calves from 3 to 10 days old, to be sure that all the antibodies in circulation were from a maternal derivation. To evaluate calves' antibody titres were made some analyses on haematic serum by testing the precipitation in sodium sulphite, using processes based on literature. As a result, were examined: 41 of Frisone italiana, 32 of Reggiana, 29 of Bianca modenese and 27 of Piemontese.

At the end of the lab analyses, we integrated all the information we achieved on Excel and we calculated, for each race, distribution, average score and confidence interval, with 95% of assurance. The results had been compared with the t-test to underline any significant difference. The significance level was 5% ($\alpha = 0,05$). The statistical significance has been reached in every bovine races' comparison, except for the one between Piemontese and Reggiana.

Moreover, were collected 10 samples of colostrum, which came from three of the four bovine races we examined on our study. These were analysed directly on the field, through automatic equalization refractometer of thermal state. Even though the lack of samples did not allow us to make statistical evaluations on colostrum, it is still useful to report the results, since they helped with the final serum analyses.

Considering the results obtained from the precipitation test in sodium sulphite, and also regarding statistical facts, it can be said that the pressure for the dairy production increased the possibility of issues on antibody transfer in calves. Also, new facts cannot give a precise explanation about the comparison between Reggiana and Bianca modenese "double attitude" with Piemontese "meat bovine".

INTRODUZIONE

1 L'immunità dei ruminanti neonati

Il sistema immunitario degli animali si basa su 2 componenti, fra loro interconnesse:

- Immunità innata: rappresentata da quei meccanismi aspecifici che si realizzano indipendentemente dal riconoscimento antigenico. Rientrano in questa tipologia le barriere fisiche, come la cute, gli enzimi nelle secrezioni, la microflora intestinale, gli acidi gastrici, il sistema del complemento e altri ancora.
- Immunità acquisita: basata su quegli elementi immunitari la cui attività è dipendente dalla stimolazione antigenica. Si genera così una risposta anticorpale e cellulo-mediata che sono mirate verso quello specifico antigene. (1)

Con il progressivo sviluppo del feto in utero, si ha una graduale comparsa dei meccanismi di difesa del nascituro contro le malattie infettive. (1) Nei bovini (*Bos taurus*) il sistema immunitario inizia a svilupparsi precocemente durante la gestazione, già a 55 giorni si possono rilevare cellule immunitarie nella milza del feto, a 2 mesi nei linfonodi e a 6 mesi nel canale digerente. (2) Nonostante questo, però, impiega un certo tempo per diventare pienamente funzionante e la resistenza iniziale alle infezioni dipende dall'attività dei meccanismi di difesa aspecifici. (1)

Alla nascita gli organi linfoidei sono popolati da cellule immunitarie che si sono sviluppate indipendentemente da una stimolazione antigenica (salvo infezioni intra-uterine avvenute durante determinati momenti della gestazione, come nel caso dei virus agenti della Para-Influenza 3 e della Diarrea Virale Bovina). Ne consegue, che dall'incontro con un antigene si potrà realizzare una risposta immunitaria primaria, ma questa sarà caratterizzata da una lunga fase di latenza prima della produzione delle immunoglobuline e da una bassa concentrazione delle stesse. Inoltre, il

numero dei linfociti B alla nascita è all'incirca il 30% di quello presente in un animale adulto; il loro numero crescerà nei primi giorni di vita, fino a raggiungere i livelli massimo solo attorno al ventesimo giorno dalla nascita. In generale le immunoglobuline prodotte dai linfociti B compaiono nel torrente circolatorio alcuni giorni dopo la nascita; ma si stima che la produzione endogena di IgG₁ sia di solo 1 grammo al giorno nel periodo compreso fra le 36 ore e le 3 settimane di vita. (1)

Anche l'immunità mucosale intestinale inizia nelle prime settimane di vita, quando, però, la maggior parte delle cellule secernenti immunoglobuline produce IgM (prime 3-5 settimane). Quelle secernenti IgA compariranno invece più tardivamente e saranno le predominanti durante la vita dell'animale adulto. (1)

La risposta immunitaria cellulo-mediata è anch'essa ridotta alla nascita ed eguaglierà quella dell'adulto solo a partire dalla seconda settimana di vita. (1)

Tutte le componenti essenziali dell'immunità sono quindi presenti alla nascita, ma molte di esse non sono pienamente funzionanti prima delle 2-4 settimane di vita e continueranno a svilupparsi fino alla pubertà. (3) I mediatori solubili sono presenti in concentrazioni subottimali (il sistema del complemento è all'incirca la metà di quello di un animale adulto) e gli elementi cellulari sono da considerarsi ancora in uno stato *naïve*. (1)

Al momento del parto, il neonato passa da un ambiente sterile e protetto, qual è l'utero, ad un ambiente ricco di microrganismi. Nelle prime ore dopo il parto le sue superfici, e l'intestino in particolare, vengono colonizzate da una complessa flora microbica. (4) Come detto, però, la risposta immunitaria umorale, quella mucosale e la cellulo-mediata sono ridotte nel vitello appena nato. (1) Per sopravvivere, il neonato deve essere in grado di controllare questa invasione ma il solo sistema immunitario innato non è sufficiente. Viene quindi in suo aiuto la madre, che gli trasferisce parte dei propri anticorpi (immunità passiva naturale) mediante il colostro. (4) (1)

Il colostro materno è ricco in immunoglobuline, cellule immunitarie, citochine e altre molecole ad attività antimicrobica. (1) Il trasferimento di immunoglobuline dalla madre al neonato è ritenuto un evento fondamentale per la protezione del neonato nei confronti delle malattie infettive; tuttavia, nel caso del bovino, il tipo di placentazione sinepitelio-coriale non permette il passaggio di immunoglobuline da madre a feto. Ne deriva che i vitelli alla nascita siano da considerare pressoché agammaglobulinemici. (5) (6) (7)

L'ingestione e l'assorbimento di un'adeguata quantità di immunoglobuline mediante il colostro è essenziale per conferire al vitello un'efficiente immunità passiva nei primi 15 giorni di vita. (5) (4)

2 Il colostro

Il colostro ed il latte forniscono al vitello una dieta completa; inoltre, nei ruminanti, il colostro materno è la sola fonte di immunoglobuline per il neonato. (8) Il colostro bovino viene descritto come un liquido denso, di colore “giallognolo”, leggermente acido (pH 6,4) (9). Si viene a formare per una miscela di secrezioni lattee e di costituenti derivanti direttamente dal sangue della bovina. Di questi ultimi, in particolare, bisogna ricordare le immunoglobuline e altre sieroproteine, che si vanno accumulando durante il periodo di asciutta della bovina. Questo processo inizia diverse settimane prima del parto sotto l’influenza di ormoni lattogenetici, inclusa la prolattina, e cessa improvvisamente al parto. (9) (10)

2.1 Composizione del colostro

Vi sono diversi costituenti del colostro che sono di rilevante importanza per il vitello, quali: le immunoglobuline, i leucociti materni, i fattori di crescita, il GH (*Growth Hormone* o “ormone della crescita” in italiano), citochine, fattori antimicrobici e numerosi nutrienti. Le diverse concentrazioni di queste componenti sono maggiori alla prima secrezione della ghiandola mammaria (colostro della prima mungitura) e tenderanno a decrescere con le successive sei munte, fino a che la composizione sarà paragonabile a quella del latte. (9)

Dalla seguente tabella [Tabella 1] si può notare come la composizione chimica del secreto mammario cambi nelle diverse percentuali con il passare del tempo e delle munte dal parto, mutando via via verso quella che sarà la composizione caratteristica del latte vaccino.

Tabella 1 Variazione percentuale della composizione chimica del secreto della ghiandola mammaria di bovine di razza *Holstein Friesian* (*Frisona americana*) (11).

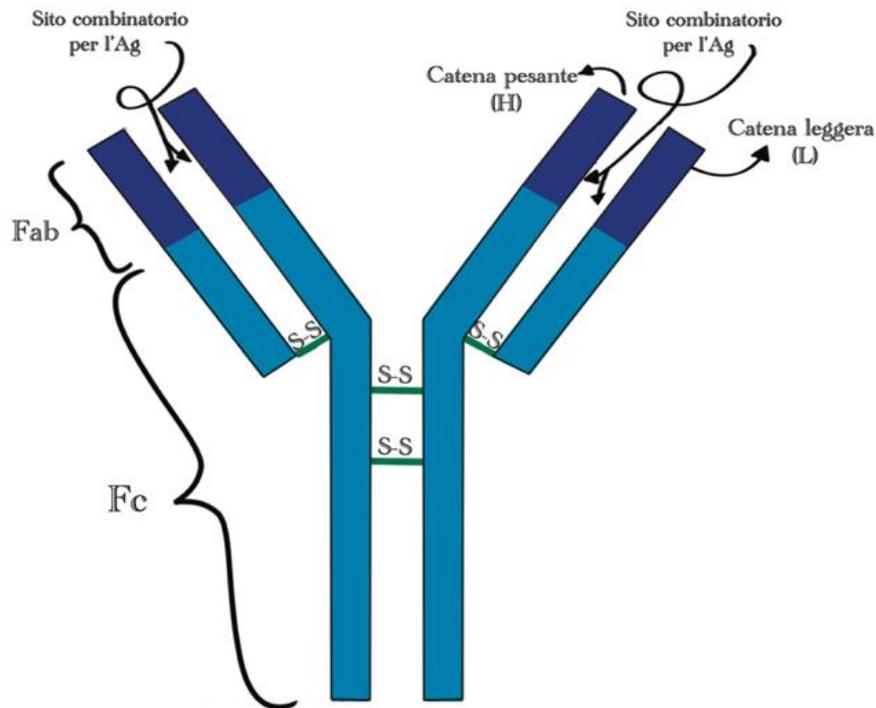
Tempo dal parto	Acqua (%)	Caseina (%)	Albumine e Globuline (%)	Grassi (%)	Lattosio (%)
0	66.4	5.57	16.92	6.5	2.13
Dopo 12h	79.1	4.47	8.98	2.5	3.51
Dopo 24h	84.4	4.23	8.98	3.6	4.24
Dopo 48h	86.3	3.91	2.63	3.7	4.51
Dopo 6 giorni	87.9	2.76	1.23	3.7	4.78
Dopo 25 giorni	87.6	3.0	0.75	3.8	4.6

2.1.1 Le immunoglobuline

Le immunoglobuline (Ig), conosciute anche come anticorpi (Ab), sono glicoproteine, prodotte dai linfociti B in seguito ad una stimolazione antigenica. Sono costituite da 4 catene polipeptidiche, uguali a due a due; vi sono infatti 2 catene leggere (dette L, dall'inglese "*light*") e 2 pesanti (dette H, dall'inglese "*heavy*") per ogni anticorpo. Le due catene pesanti sono fra loro connesse mediante forze non covalenti e ponti disolfuro (S-S); questo conferisce agli Ab la caratteristica forma ad Y. Se un anticorpo è costituito da una sola Y è definito "monomero", altrimenti è un polimero, formato da diversi monomeri. (4)

Le "braccia corte" della Y rappresentano le regioni variabili, che servono per legare gli antigeni (Ag) e vengono definite Fab (*Fragmente antigen binding*). Il "gambo", invece, è il frammento costante e viene definito come Fc (*Fragment constant*) [Figura 1]. La porzione Fc svolge diverse funzioni, ai fini della presente trattazione è importante ricordare che è proprio grazie ad essa che alcune classi di immunoglobuline passano dal torrente circolatorio materno al colostro. (4) (1)

Figura 1 Rappresentazione schematica di una immunoglobulina in forma monomerica; sono state raffigurate le catene pesanti (H), le leggere (L), i siti combinatori per l'Ag (in blu scuro), i ponti disolfuro (S-S) e le porzioni Fc e Fab. (Disegno personale).



Nei mammiferi sono descritte 5 classi di immunoglobuline: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE che possiamo rilevare in diversi fluidi corporei e secrezioni (sangue, latte, colostro, lacrime e muco). (4) (1)

Gli anticorpi hanno diversi meccanismi d'azione, i principali sono i seguenti.

- **Attività neutralizzante:** reagendo con tossine o virus ne bloccano l'azione nociva. Nel caso dei virus ne neutralizzano l'infettività legandosi alle strutture di superficie, per mezzo delle quali interagirebbero con le cellule dell'organismo per penetrarvi.
- **Attività agglutinante:** gli Ab reagiscono con le strutture a valenza antigenica di batteri e cellule eucariote causandone l'agglutinazione e stimolando la

fagocitosi da parte delle cellule del sistema immunitario. È un'attività tipica degli anticorpi secreti a livello di mucosa respiratoria ed intestinale.

- **Attività precipitante:** reagendo con gli antigeni solubili, gli Ab li trasformano in precipitati solidi e, pertanto, inattivi.
- **Attività opsonizzante:** gli Ab, dopo aver reagito con un Ag, divengono particolarmente reattivi nei confronti dei recettori di membrana di macrofagi e neutrofili, ai quali si legano mediante la propria porzione Fc.
- **Fissazione del complemento:** gli Ab di classe IgM e IgG sono in grado di fissare il complemento; con questo termine si indica l'attivazione a cascata di quella serie di enzimi in grado di lisare gli Ag invasori con i quali hanno reagito. (4)

Nell'ultimo terzo di gravidanza la bovina inizia a produrre colostro e si assiste ad un accumulo di immunoglobuline nel lume della ghiandola mammaria; questo processo prende il nome di "colostrogenesi". (1) (4) Durante questo breve periodo vengono trasferiti nel secreto mammario oltre 500 grammi di IgG a settimana. (1) Le IgG₁ sono oltre l'85% delle immunoglobuline totali presenti nel colostro ed è per questo che vengono prese come punto di riferimento. (1) Per contro le IgA e le IgM sono presenti a più basse concentrazioni; le prime sono state stimate essere all'incirca il 7-10% delle Ig totali mentre le seconde variano fra l'8-10%. (11)

Da diversi studi si può notare come la concentrazione delle diverse classi di immunoglobuline sia differente da specie a specie, questo è dovuto proprio alla diversa modalità di trasmissione di immunità passiva al nascituro. Nel caso dei ruminanti il colostro è l'unica fonte di Ig per il piccolo e per questo prevalgono le IgG [Tabella 2], che verranno successivamente assorbite dal vitello a livello intestinale e passeranno intatte nel torrente circolatorio. (8) (1) (12)

Tabella 2 Concentrazione delle diverse classi di immunoglobuline nel colostro e nel latte bovino; tabella tratta dal libro "Veterinary Medicine: a textbook of diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats" (13).

Classe di Immunoglobuline	Concentrazione (mg/mL)		Presenza percentuale (%)	
	Colostro	Latte	Colostro	Latte
IgG₁	75,0	0,59	81	73
IgG₂	2,9	0,02	5	2,5
IgA	4,4	0,14	7	18,0
IgM	4,9	0,05	7	6,5

Le immunoglobuline di origine colostrale possiedono un doppio ruolo protettivo; alcune vengono assorbite e passano intatte nel torrente circolatorio, proteggendo dalle setticemie, altre restano nell'intestino e agiscono da inibitrici dell'adesione dei patogeni. (14)

Le IgG sono prodotte da plasmacellule a livello di milza, linfonodi e midollo osseo. Sono le immunoglobuline con la concentrazione più alta a livello sierico ed essendo molto piccole (hanno un peso molecolare di 150kD) e monomeriche, possono facilmente lasciare il torrente circolatorio. Svolgono diverse funzioni immunitarie, quali agglutinazione, opsonizzazione e neutralizzazione virale. (4)

Come detto, nel colostro le IgG rappresentano più dell'85% delle immunoglobuline totali presenti e sono considerate le più importanti per quanto riguarda l'immunità passiva colostrale. (1) Di questa classe di immunoglobuline riconosciamo 2 isotipi: IgG₁ e IgG₂; il rapporto fra i due isotipi è di 35:1. (11) Non vengono prodotte direttamente a livello mammario ma vengono captate selettivamente dal fluido

extracellulare, trasportate attraverso il citoplasma cellulare per mezzo di vescicole e rilasciate a livello di superficie apicale delle cellule della ghiandola mammaria, all'interno del lume ghiandolare. (1) (9) Le IgG iniziano ad essere trasferite dal siero della madre alla ghiandola mammaria a partire da alcune settimane prima del parto, con un picco massimo 1-3 giorni prima dell'evento. (5) Questo è possibile grazie alla presenza di un recettore specifico per legare la porzione Fc dell'immunoglobulina, che viene espresso sulla superficie delle MEC (*Mammary Epithelial Cells*). Tale recettore prende il nome di FcRn (*neonatal Fc receptor*) ed è espresso in abbondanza a livello di membrana baso-laterale delle MEC sola durante la fase di produzione del colostro (2-3 settimane prima del parto (2)) ma non altrettanto in piena lattazione. L'espressione dell'FcRn sarebbe dovuta agli ormoni che agiscono durante la prima fase del processo di lattogenesi (estrogeni e progesterone). Durante la seconda fase di lattogenesi invece, quando abbiamo la montata latte, l'equilibrio ormonale muta, a favore della prolattina, e l'espressione degli FcRn viene meno, con conseguente crollo dei livelli di IgG nel latte rispetto al colostro. Grazie a questa captazione selettiva, la concentrazione di IgG nel colostro è fino a 5-10 volte (4) maggiore rispetto a quella presente nel siero della vacca. (2) (1) (5) (9) (8) (4) (15)

In letteratura viene riportato uno studio nel quale si afferma che il 10% delle bovine analizzate abbia una maggior capacità di trasportare IgG a livello di lume della ghiandola mammaria. L'articolo riporta ancora, che questo fenomeno sarebbe da attribuire a fattori genetici o ormonali in grado di incrementare il trasporto di tali immunoglobuline nel lume ghiandolare, suggerendo quindi un certo interesse per studi futuri di genetica, al fine di favorire maggiori concentrazioni di IgG nel colostro delle bovine. (12)

Le IgA sono prodotte dalle plasmacellule localizzate a livello di superfici corporee (intestino, apparato respiratorio, apparato urinario, cute, ghiandola mammaria, occhi) ma sono presenti nel siero in concentrazioni inferiori rispetto alle IgM. Vengono secrete sotto forma di dimeri (2 monomeri uniti da una catena J) e, nel momento del passaggio attraverso l'epitelio di rivestimento, acquisiscono un'ulteriore componente (una glicoproteina), definita pezzo secretorio o SC

(*Secretory Component*); in questo momento vengono definite quindi IgA secretorie (IgAS). Tale classe di immunoglobuline svolge un ruolo difensivo fondamentale nei distretti corporei dove viene secreta, esplica infatti azione di agglutinazione e neutralizzazione dei virus. (4)

Degno di nota, ai fini della presente trattazione, è il concetto dell'asse enteromammario; il meccanismo grazie al quale ritroviamo nel colostro immunoglobuline specifiche contro antigeni riconosciuti dal sistema immunitario della bovina a livelli intestinale. Nella parete intestinale sono presenti numerosi linfociti B che reagendo agli Ag estranei che incontrano nell'intestino replicano ripetutamente. Questi linfociti B-IgA positivi, e le plasmacellule IgA-secernenti che ne derivano, fanno parte del così detto GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*), l'organo immunitario di maggiori dimensioni in un animale. Tali cellule hanno affinità per tutte le superfici corporee e sono in grado di migrare dall'intestino, sfruttando la circolazione sistemica, verso altri distretti, fra i quali la ghiandola mammaria. La migrazione di questa classe di linfociti B, verso la ghiandola mammaria, è guidata da chemochine prodotte localmente, che li richiamano. Una volta giunti a destinazione maturano e si trasformano in plasmacellule secernenti IgA. Come per le IgG, sulla superficie delle MEC vengono espressi recettori specifici per questa classe immunoglobulinica che, per le IgA, sono i pIgR (*polymeric Immunoglobulin Receptor*). Questi recettori le legano e ne permettono la traslocazione attraverso la cellula mammaria. Una volta che l'IgA ha attraversato il citoplasma, il pIgR viene clivato e l'immunoglobulina rilasciata nel secreto mammario sotto forma di IgAS. Nel colostro sono quindi presenti immunoglobuline specifiche per quegli antigeni che la bovina ha incontrato a livello intestinale. Sembrerebbe inoltre, che la porzione secretoria dell'immunoglobulina, oltre a favorire la funzionalità dell'IgA, abbia essa stessa capacità protettive e sia in grado di bloccare l'adesione degli *Escherichia coli* enterotossigeni, e di altri patogeni, all'epitelio intestinale. (4) (12) (8)

Le IgA rappresentano solamente il 7-10% (15) delle immunoglobuline totali presenti nel colostro ma sono di fondamentale importanza perché forniscono al vitello una protezione immunitaria specifica contro gli Ag ambientali che incontra, inevitabilmente, al momento della nascita e che giungono nel suo intestino. (4) (12) (11)

Le IgM sono la classe di immunoglobuline più rappresentate nel siero dei mammiferi dopo le IgG ma nel colostro sono presenti solo per l'8-10%. (15) Le IgM prodotte dalle plasmacellule sono dei pentameri, sono quindi di notevoli dimensioni (peso molecolare di 900kD (4)) e raramente riescono ad uscire dai vasi; pertanto, svolgono le loro azioni principalmente a livello di torrente circolatorio. (4) (15)

Sono gli anticorpi maggiormente prodotti in seguito al primo incontro con un antigene (risposta primaria). La loro produzione continua anche durante la risposta secondaria, tuttavia, alla seconda esposizione ad un antigene, la classe di Ig maggiormente prodotte sono le IgG. Anche se vengono prodotte in piccole quantità, le IgM sono più efficaci delle IgG nelle funzioni di attivazione del complemento, opsonizzazione, neutralizzazione virale e agglutinazione. Questo è dovuto al fatto che possiedono ben 10 siti combinatori, contro i 2 delle immunoglobuline monomeriche, e quindi possono legare fino a 10 Ag contemporaneamente. (4)

Come per le IgA, anche le IgM vengono trasferite nel colostro grazie al recettore pIgR espresso sulle MEC, che le lega, ne permette l'endocitosi e si cliva all'apice della cellula mammaria, permettendone così la secrezione. (11) (12)

L'origine delle diverse classi di immunoglobuline presenti nel colostro appare quindi essere differente. Le IgG derivano interamente dal circolo ematico materno. Le IgA sono prodotte per il 60% da plasmacellule residenti nella ghiandola mammaria, anche se la maggior parte di questi linfociti è migrato dall'intestino (asse entero-mammario). Le IgM, invece, vengono prodotte solo per il 15% localmente e provengono, prevalentemente, dal torrente circolatorio, dove sono la classe di Ig più rappresentata. (4)

In uno studio condotto su bovine di razza Holstein Friesian si riporta che il contenuto in solidi totali sia, mediamente, del 23,9%, per il colostro, e del 12,9%, per il latte. (9) Questa notevole differenza in sostanza solida fra colostro e latte è dovuta, principalmente, all'elevato contenuto proteico del primo secreto della ghiandola mammaria, che è rappresentato dalle immunoglobuline e, in secondo luogo, dalle caseine. (9) Si sottolinea così ancora una volta quanto le immunoglobuline siano importanti nella composizione del colostro.

2.1.2 Leucociti materni

Normalmente il colostro bovino ha un contenuto in cellule immunitarie attive, di origine materna, maggiore di 1×10^6 cellule/mL. (1) (9) Di questa popolazione cellulare fanno parte: macrofagi, neutrofili, linfociti T e B. (1) Si ritiene che, una volta giunte nell'intestino del vitello (tratto digiuno-ileo nello specifico), alcune di queste cellule vengano assorbite attraverso l'epitelio follicolo-associato delle placche del Peyer. Una volta penetrate nel torrente circolatorio del neonato vi permangono per circa 24-36 ore. Le loro funzioni sono però ancora poco chiare; presumibilmente queste cellule hanno un effetto positivo sulla maturazione del sistema immunitario del neonato, stimolando la fagocitosi, le capacità battericide e la produzione di IgG da parte del sistema immunitario del vitello. (9) Altri autori parlano di studi in cui si ritiene che tali cellule possano avere una certa importanza nella protezione delle immunoglobuline, contro la digestione enzimatica, nel passaggio attraverso il tratto gastro-enterico. Ancora, potrebbero svolgere la funzione di cellule presentanti l'antigene, secernere citochine implicate nella risposta infiammatoria, produrre ROS (reactive oxygen species) e peptidi antimicrobici (1) (8)

Questi aspetti sono ancora in fase di studio e per il momento le varie evidenze riportate si riferiscono a studi isolati che necessiterebbero di ulteriori conferme. Per certo sappiamo, però, che nel colostro è presente anche una certa quota di popolazione cellulare del sistema immunitario materno. (1) (8) (9)

2.1.3 Fattori antimicrobici

L'azione difensiva del colostro non si esplica solamente attraverso gli anticorpi e le cellule immunitarie in esso contenuti ma vi sono anche altre importanti molecole che adempiono a questa funzione, avendo attività batteriostatica e germicida aspecifica. Tali molecole fanno parte del sistema immunitario innato della mammella, vengono sintetizzate direttamente dalle MEC e rilasciati nel colostro. Di queste citiamo la lattoferrina, il lisozima, la lattoperossidasi, le β -difensine e gli oligosaccaridi. (9) (8) (11)

La lattoferrina è presente nel colostro ad una concentrazione elevata (2-5 mg/mL (2)), mentre nel latte è tutto sommato bassa. Esplica un'azione batteriostatica legando il ferro; infatti, privando i batteri di questo elemento, se ne inibisce la crescita. Tuttavia, questo meccanismo non è efficiente nei confronti dei lattobacilli e di *Streptococcus* spp., che non necessitano di elevate concentrazioni di ferro per vivere. Da notare il fatto che la lattoferrina viene inattivata dal pH acido (< 3-5 (2)) per questo è attiva solo a livello intestinale, a patto che le condizioni di pH siano favorevoli. (2) (11)

Il lisozima ha proprietà germicide e la sua azione viene incrementata dalla presenza contemporanea di immunoglobuline. Viene riportato, però, che, al proseguire delle mungiture, mentre i valori di Ig divengono via via decrescenti, quelli di lisozima subiscono invece un incremento. È un enzima resistente alle proteasi del tratto gastro-enterico, per tanto passa intatto nel piccolo intestino, dove esplica la sua azione nei confronti dei batteri Gram +. (11) (2)

Anche la lattoperossidasi ha attività batteriostatiche e germicide. È un enzima che, in presenza di perossido di idrogeno, tiocianato e iodio, è responsabile di reazioni di catalizzazione dell'ossidazione, mediante le quali genera agenti ossidanti molto reattivi. Questi ultimi sono in grado di antagonizzare i sistemi cellulari di crescita, di respirazione e di trasporto dei patogeni a livello intestinale. (14)

Infine, gli oligosaccaridi non agiscono direttamente nei confronti dei batteri, ma sono degli inibitori competitivi per i siti di legame sulla superficie delle cellule intestinali dei villi. (12)

2.1.4 Citochine e fattori di crescita

Si hanno a disposizione pochi dati relativamente alle citochine libere nel colostro e gli studi analizzati da G. M. Barrington e S. M. Parish mostrano dati contrastanti per quanto riguarda le variazioni nelle concentrazioni di tali molecole nel secreto mammario. (1) Per tanto, il loro ruolo nel colostro è ancora controverso.

Per quanto riguarda i fattori di crescita, invece, è certa la loro importanza per lo sviluppo del neonato. Il colostro è ricco in IGF-1 (*Insulin-Like Growth Factor*), al quale vengono attribuiti importanti funzioni nello stimolare lo sviluppo del tratto gastro-enterico del vitello e che potrebbe aiutare anche nella maturazione del sistema immunitario stesso. (1) (9)

Non solo l'IGF-1 ma anche altri fattori di crescita sono stati rilevati nel colostro, quali il TGF- β 2 (*Transforming Growth Factor beta due*) ed il GH. (1) (9)

I dati relativi a queste molecole sono ancora scarsi ma gli autori concordano nel ritenerle di rilevante importanza per un adeguato sviluppo del nascituro nei primi giorni di vita. (1) (9)

2.1.5 Nutrienti

Il colostro, per il vitello, non è solamente di fondamentale importanza per quanto concerne gli aspetti legati alle sue funzioni immunitarie, lo è anche per il supporto nutrizionale che gli fornisce. (9)

Diversi studi riportano che il colostro delle bovine di razza Frisona abbia un contenuto in grassi pari al 6,7%, notevolmente superiore rispetto a quello medio del latte, che è pari solo al 3,6%. (9) (16)

Ricordiamo poi il lattosio, disaccaride tipico ed esclusivo della ghiandola mammaria, principale zucchero contenuto nel latte e sintetizzato a partire da glucosio e galattosio. (16)

Grassi e lattosio sono una fonte indispensabile di energia per il neonato; grazie ad essi il cucciolo è in grado di attuare la termoregolazione nei primi giorni di vita e fornire energia ai propri organi per permettere l'esplicarsi delle funzioni vitali. Il lattosio stimola inoltre l'attività e lo sviluppo del sistema nervoso. (9) (11) (16)

Il colostro, così come il latte, è una fonte di sali minerali (Ca, Na, K, Mg, Mn, Zn, Se, Co, Fe ed altri ancora); una carenza di questi micro- e macro-elementi risulta in un

minor sviluppo delle masse muscolari e maggior suscettibilità alla diarrea neonatale. (11) Il contenuto in sali minerali è dalle 2 alle 10 volte superiore nel colostro rispetto al latte. (16) La concentrazione dei diversi elementi è, però, notevolmente influenzata dal loro contenuto nella razione della bovina nelle settimane precedenti il parto e dai suoi consumi fisiologici. (16) (11)

Ultimi elementi contenuti nel colostro che citiamo, ma non per l'importanza, sono le vitamine (vitamina A, vitamina E, riboflavina, vitamina B12, acido folico, colina...); nel colostro certe sono presenti in concentrazioni maggiori, mentre altre sono meno rappresentate rispetto al latte. Cooperano all'esplicazione di diverse funzioni nelle difese dell'organismo, agiscono come antiossidanti proteggendo le membrane cellulari, regolano l'attività di trascrizione genica, stabilizzano le membrane cellulari e svolgono altre funzioni ancora. (9) (11)

Appare quindi chiaro che il colostro sia essenziale per i neonati sotto molti aspetti; ai fini della presente ricerca ci siamo focalizzati, e ci focalizzeremo, maggiormente, sulle funzioni svolte dalle immunoglobuline.

2.2 Qualità del colostro e come valutarla

Tendenzialmente quando si parla di “qualità del colostro” se ne intende il contenuto in immunoglobuline, in particolare di gammaglobuline, che sono le più rappresentate. (9) Il colostro è considerato di qualità buona quando presenta una concentrazione di IgG superiore ai 50g/L, che è il tasso minimo in grado di conferire un adeguato trasferimento di immunità passiva al vitello. (5) (17)

La sua qualità è probabilmente il criterio più efficiente per valutare se sia idoneo per prevenire e combattere le enteriti neonatali nel vitello. Se il colostro è di qualità idonea si evita l’insorgere del fenomeno conosciuto come FPT (*Failure of Passive Transfer*), che possiamo tradurre come “fallimento del trasferimento dell’immunità passiva materna”. (18) (19) (Questi concetti verranno affrontati nel dettaglio più avanti.)

Si sono studiate, e sono oramai ben affermate grazie a numerosi studi, diverse metodiche per la valutazione qualitativa del colostro. (17) (19) (11)

Il peso specifico del colostro è correlato con il contenuto in sostanza solida totale e quindi di immunoglobuline, che rientrano, appunto, in questa categoria. Proprio basandosi su questo concetto, una delle metodiche di campo più utilizzate è l’impiego di un densimetro, anche conosciuto come “colostrimetro”. (17) (11) Questo strumento viene immerso nel colostro, misurandone così la densità; una scala graduata restituisce il valore di densità ed il contenuto di immunoglobuline stimato. Si considera come “buono” un colostro che possiede un peso specifico > 1.050 mg/dL e che si stima contenga almeno 50 mg/mL di anticorpi. (17) (11) Tuttavia, nonostante il colostrimetro sia molto diffuso nelle aziende e venga impiegato spesso dagli allevatori, i valori di sensibilità appaiono discordati per questo strumento in diverse ricerche, suggerendo che il densimetro non sia lo strumento migliore per un’accurata stima della qualità del colostro. La misurazione è infatti fortemente influenzata da fattori quali il volume analizzato, la temperatura e la concentrazione delle altre componenti presenti nel colostro. (19)

Un altro strumento, che può essere facilmente impiegato in campo, è il rifrattometro. Diversi esperti sembrano concordare sul fatto che sia più sensibile e preciso del colostrimetro nella misura del contenuto anticorpale. (11) (17)

Mediante l'impiego del rifrattometro si può determinare la concentrazione di una soluzione acquosa; lo strumento restituisce un valore in base all'indice di rifrazione della luce che attraversa la soluzione. Molti dei moderni rifrattometri sono dotati di un sistema automatico di compensazione della temperatura (sono siglati con la scritta ATC), il che permette di avere un risultato immediato in fase di lettura, senza dover impiegare delle scale di riferimento per correggere il dato. Il rifrattometro inoltre, rispetto al densimetro, presenta altri vantaggi; infatti, basta una piccolissima quantità di colostro per effettuare la lettura (appena una o due gocce) e si ha un'elevatissima correlazione fra la concentrazione di Ig e i gradi Brix ($R^2=0.6-0.7$). (11)

Un colostro è considerato di buona qualità se il valore di Brix è > 20 (20) - 22% (17). In Tabella 3 vengono riportati i valori della scala Brix e la concentrazione di gammaglobuline equivalenti (g/L). (17) (20)

Brix (%)	Qualità del colostro	IgG (g/L)
<17	Scadente	0-25
18-20	Scarsa	25-50
20-30	Buona, nella media	50-100
>30	Molto buona	>100

Tabella 3 Come interpretare i risultati che vengono letti in gradi Brix attraverso il rifrattometro. Valori presi dal libretto di istruzioni del rifrattometro Kerbl (20).

Esistono anche dei *kit on-site* da poter impiegare comodamente in campo, che si basano su di una reazione di tipo immunoenzimatico. (5)

Il “*Gold Standard*” per la valutazione del colostro è tuttavia l’immunodiffusione radiale, anche detta RID (*Radial Immuno-Diffusion*). Per impiegare questa tecnologia si deve prelevare un campione di colostro ed inviarlo ad un laboratorio specializzato, che provvederà ad analizzarlo. Risulta quindi poco applicabile in campo, poiché più costoso delle metodiche precedentemente descritte e necessita anche di tempistiche più lunghe. (11) (17)

2.3 Fattori influenzanti la qualità del colostro.

Il contenuto immunoglobulinico del colostro varia da bovina a bovina. Inoltre, nel singolo animale, man mano che si procede con le mungiture il contenuto va via via decrescendo; mutando così verso la composizione tipica del latte. (8) (9) In uno studio condotto nel 2007, su bovine di razza Holstein, si riportano valori individuali di IgG che vanno dai 9 ai 186 g/L. (9) Questa grande variabilità nel contenuto anticorpale del colostro sarebbe dovuta a fattori individuali e ambientali: numero di lattazioni sostenute ed età della bovina, genetica, prima mungitura dal parto, alimentazione durante il periodo di asciutta e durata dello stesso, stagione, vaccinazioni, stato sanitario della bovina e mastiti. (9) (11) (21)

2.3.1 Numero di lattazioni sostenute ed età della bovina

Il numero di lattazioni sostenute dalla bovina è un indice indiretto dell'età dell'animale ed è uno dei punti più studiati e forse anche dibattuti. (22) (9) (11)

Jeff W. Tyler et al. riportano che le bovine di razza Holstein, da loro studiate, presentino differenze nel contenuto anticorpale in relazione con il numero di lattazioni sostenute. Le primipare (bovine alla prima lattazione) avrebbero fatto registrare valori medi di immunoglobuline pari a 66 g/L, contro i 97 g/L delle terzipare. (22) L'assunto secondo il quale le primipare abbiano un colostro di minor qualità, poiché più giovani e quindi con un sistema immunitario che ha incontrato ancora pochi patogeni, sembrerebbe essere confermato da questi dati. (22) Tuttavia, sempre nel suddetto studio, le bovine di razza Guernsey hanno fatto registrare, invece, valori di immunoglobuline colostrali pari a 119 g/L per le primipare e di 115 g/L per le terzipare. (22) Tale razza sembrerebbe andare quindi contro tale teoria, confermando invece l'assunto secondo il quale le pluripare abbiano un colostro di minor qualità poiché presentano una montata latte più dirompente, con un conseguente effetto diluizione del colostro. (23) (9) (11)

Analizzando i vari studi condotti al riguardo negli anni, gli esperti sono arrivati alla conclusione che non vi siano differenze statisticamente significative fra il colostro di una primipara e quello di una bovina alla terza-quarta lattazione (23) (5) (9)

2.3.2 Genetica: razza, attitudine produttiva e volume di colostro prodotto

La composizione del colostro, fra cui il contenuto immunoglobulinico, cambia in relazione ad una componente dovuta alla genetica della bovina. (11)

L'attitudine produttiva sembrerebbe influenzare fortemente la qualità del colostro. Nelle razze da carne il contenuto immunoglobulinico è notevolmente superiore rispetto alle razze da latte; questo non perché nelle bovine da carne il trasporto di Ig sia maggiore, anzi sembrerebbe essere vero il contrario, ma perché nelle vacche da latte si ha un maggior effetto diluizione (24) (19)

Sono stati condotti diversi studi relativamente alle principali razze bovine e si è dimostrato che anche fra le singole razze con la stessa attitudine vi sia una notevole differenza qualitativa del colostro. (22) Prendendo a titolo di esempio alcune delle razze bovine più conosciute, in letteratura si riporta che il primo secreto mammario dopo il parto delle Frisone presenti una concentrazione in Ig pari al 5,6%, quello delle Guernsey sia del 6,3%, per le Brown Swiss del 6,6%, nelle Ayrshire dell'8,1% e, in fine, nelle Jersey del 9,0%. (9) (21)

M.A. Guy et al. affermano che l'entità della lattogenesi potrebbe essere un fattore importante nel determinare la concentrazione finale di immunoglobuline nel colostro. Analizzando i livelli sierici dell'a-lattoalbumina, proteina implicata nella sintesi del lattosio, hanno notato che i suoi livelli ematici preparto sono fino a cinque volte maggiori nelle razze da latte rispetto a quelle da carne. Il che sarebbe collegato ad un processo di lattogenesi significativamente più intenso nel preparto, con secrezioni conseguentemente maggiori di colostro ed una inevitabile diluizione anticorpale. (24) Ricerche successive hanno confermato questo concetto. Secondo quanto riportato in uno studio condotto su bovine di razza Jersey, quando la quantità di colostro prodotta aumenta (da meno di 3 Kg a 3-6 Kg, fino a superare i 6 Kg), la concentrazione di Ig diminuisce. (11) In un altro studio, condotto su due allevamenti di bovine da latte con diversi livelli produttivi, sono stati messi a confronto due allevamenti di bovine di razza Frisone polacca (*Polish Holstein Friesian*). Il primo ad elevata produzione (8.000 kg di latte/capo/lattazione) ed il secondo, invece, con livelli nella media nazionale polacca (5.500 kg di latte/capo/lattazione). (25) Gli

autori di quest'ultimo studio affermano che la concentrazione di IgG nel colostro sia correlata negativamente con le *performance* produttive delle bovine, il che significa che bovine ad elevata attitudine lattifera producono colostro con una bassa concentrazione di immunoglobuline. (25)

2.3.3 Prima mungitura dal parto

La concentrazione di Ig nel colostro è nel suo picco immediatamente dopo il parto ma diminuisce se si ritarda troppo la prima mungitura. Se non si munge subito la bovina le IgG vengono riassorbite dal secreto mammario per una quota pari a circa il 3,7% al trascorrere di ogni ora dal momento del parto. (26) Sandra Godden riporta di uno studio fatto posticipando la prima mungitura a 6, 10 e 14 ore dal parto, affermando che vi sia, rispettivamente, un calo nella concentrazione di IgG pari al 17%, 27% e 33%, rispetto a bovine munte entro 1-2 ore dal parto. (9) Sulla base di questi risultati si consiglia, pertanto, di mungere le bovine entro massimo 6 ore da quando è nato il vitello. (9) (26)

2.3.4 Periodo di asciutta

Il periodo di asciutta della bovina può avere un impatto significativo sulla composizione quali-quantitativa del colostro; sia per quanto riguarda la durata, che viene imposta dall'allevatore, che per l'alimentazione delle bovine in questa fase così delicata. (11) (9) (21)

La secrezione di immunoglobuline, a livello di ghiandola mammaria, inizia approssimativamente a 5 settimane dal parto. (9) Inoltre, la prima secrezione da parte della ghiandola mammaria è un pre-colostro, ricco in IgA e che vedrà un cambiamento nella sua composizione chimica con il passare del tempo, non solo per le immunoglobuline ma anche per le altre proteine ed i lipidi. (11)

Un periodo di asciutta della durata compresa fra i 28-56 giorni non compromette la qualità del colostro ma se inferiore ai 21 giorni si assiste ad una ridottissima concentrazione di IgG. (9) Nonostante 28 giorni bastino per avere un contenuto in

gammaglobuline adatto per il vitello, meno di 40 giorni sono ritenuti inadeguati per una corretta messa in asciutta. (9) Grazie ad uno studio condotto su bovine di razza Frisona si è visto che, riducendo l'asciutta dai 60 giorni canonici a 40, si perdono fino a 2,2 kg di colostro. (9) (21)

Dai *reports* di diversi studi, l'alimentazione nella fase di asciutta non sembrerebbe avere un impatto sul contenuto immunoglobulinico del colostro. È stato però visto che una dieta integrata con vitamina E e selenio favorisce una maggior produzione di colostro. (9)

Il selenio è un componente importante delle seleno-proteine, che proteggono i tessuti dallo stress ossidativo. Visto che il sistema immunitario è molto sensibile alle condizioni dismetaboliche, una carenza di Se ne potrebbe compromettere la capacità di sintetizzare Ig. Alcune selenoproteine, inoltre, agiscono come "immunomodulatori", soprattutto nell'attività battericida dei leucociti. (21)

La vitamina E, o tocoferolo, è un potente antiossidante che svolge un ruolo importante nella protezione delle membrane cellulari dalla perossidazione dei lipidi di membrana ad opera dei radicali liberi. (21)

Vitamina E e Se risultano, quindi, molto importanti per la produzione quantitativa del colostro in fase di asciutta e, molto probabilmente, anche per la sua qualità. (21)

Come dimostrato da alcuni studi, le integrazioni in oligoelementi sono molto utili ma le razioni devono comunque essere ben formulate. Diete sbilanciate, carenti in energia e proteine (o meglio amminoacidi) hanno sicuramente un'influenza negativa sulla qualità del colostro stesso. Le immunoglobuline sono infatti molecole di natura proteica e devono essere elaborate dal sistema immunitario della bovina; le cellule necessitano di amminoacidi per la sintesi proteica e, visto l'alto indice mitotico delle cellule immunitarie, anche di elevati livelli energetici. (21) (4)

2.3.5 Stagione del parto

Alcuni studi affermano che l'esposizione a temperature ambientali elevate, nell'ultima fase della gestazione, abbia un'influenza negativa sulla composizione del colostro. Nei periodi più caldi si sarebbero registrate, infatti, concentrazioni inferiori di IgG, IgA, proteine totali, caseine, lattoalbumine, grassi e lattosio. (9) (21) Le motivazioni per cui ciò si verifichi sono le seguenti:

- 1° Lo stress da caldo induce le bovine ad alimentarsi meno volentieri, portandole quindi ad avere delle carenze nutrizionali; ritorniamo quindi al punto precedente, sull'alimentazione della bovina in asciutta. (9)
- 2° Il flusso ematico alla mammella viene ridotto con il caldo, in favore della termoregolazione e questo si traduce in un minor passaggio di molecole dal torrente ematico alla ghiandola mammaria. (9)
- 3° Non ultimo il fatto che lo stress abbia un'influenza negativa sull'attività del sistema immunitario; motivo per il quale le plasmacellule mammarie secernenti IgA sintetizzano anche meno immunoglobuline. (9) (4)

È molto importante, quindi, che gli allevatori adottino gli accorgimenti del caso per far fronte alla calura estiva, soprattutto per le bovine prossime al parto. (9)

2.3.6 Stato sanitario della bovina e mastiti

L'opinione comune dei ricercatori è che le bovine affette da patologie locali o sistemiche (mastiti, acidosi cronica, chetosi, stress e altre ancora...) producano colostro di qualità inferiore; carente non solo nel contenuto immunoglobulinico, ma anche in nutrienti. (11) (9) (21)

Per "mastite" si intende l'infiammazione della ghiandola mammaria, causata, principalmente, da batteri mastidogeni. Trattandosi di una infiammazione di natura infettiva, la mammella reagisce mediante un "*up-regulation*" del sistema immunitario innato all'inizio e, successivamente, adattativo. (8) Questa condizione infiammatoria

ha un impatto negativo sulla ghiandola mammaria e, se permane durante la fase di asciutta, si ripercuoterà sulla produzione quali-quantitativa di colostro. Alcuni ricercatori sembrano però discordare con questa teoria, ritenendo che le mastiti causino solamente una ridotta produzione quantitativa e non qualitativa. (11) (9)

Aspetto fondamentale da considerare è che, in corso di mastite, la mammella secerne meno inibitori della tripsina, fattori fondamentali per la protezione delle Ig nel transito gastro-enterico del vitello. Una minor secrezione di inibitori della tripsina si traduce in una maggior digestione delle immunoglobuline a carico della tripsina e, quindi, in un minor quantitativo di anticorpi che giunge intatto a livello intestinale. La mastite ha quindi anche un effetto importante sulla capacità del tratto gastro-enterico del vitello stesso di assorbire le Ig intatte. (11) (27)

Quando la bovina è affetta da mastite non bisogna poi trascurare la presenza dei patogeni a livello mammario; una mammella infetta produce un secreto mammario infetto. La contaminazione batterica del colostro, in particolare da coliformi, oltre ad essere una potenziale fonte di patologie per il vitello, ha anche un impatto negativo sull'efficienza del trasferimento immunitario. I batteri possono infatti legare le immunoglobuline libere nel tratto gastro-enterico riducendone di fatto l'assorbimento attraverso la parete intestinale. (28)

Gli allevatori non dovrebbero quindi nutrire i vitelli con colostro proveniente da bovine affette da mastite. (9)

2.3.7 Vaccinazioni

Dal momento che la bovina sviluppa immunoglobuline dirette contro gli Ag che il suo sistema immunitario incontra, così come vengono prodotti anticorpi specifici verso i patogeni circolanti in azienda, vengono prodotti anche Ab nei confronti degli Ag che le vengono inoculati attraverso la vaccinazione. La pratica della vaccinazione della bovina in asciutta ha un'indiscussa utilità per trasferire al vitello una maggior varietà di anticorpi; ricordiamo, per esempio, l'utilità di questa pratica nel prevenire le gastro-enteriti neonatali da rota- e corona-virus. (18) (9)

Alcuni ricercatori affermano però anche che la vaccinazione, o il richiamo vaccinale, delle bovine, nelle 3-6 settimane prima del termine della gravidanza, abbia un ulteriore effetto utile, ovvero aumenti la concentrazione di anticorpi nel colostro. (9) (8) Questo ultimo aspetto è però dibattuto in letteratura.

Stando ai dati attuali si può affermare con certezza solamente che la vaccinazione sia molto utile per trasferire, nel colostro, immunoglobuline specifiche verso quei patogeni che potrebbero essere causa di patologie neonatali per il vitello. (5) (18) (9)

2.4 Gestione del colostro dopo la mungitura

Come visto, il colostro è una fonte indispensabile di immunoglobuline per il vitello neonato, ma se gestito inadeguatamente, può divenire un veicolo di batteri patogeni, causa di enteriti neonatali. (28)

Per soddisfare gli standard di buona qualità, il colostro dovrebbe contenere meno di 100.000 UFC/mL di carica batterica totale (TPC: *Total Plate Count*) e meno di 10.000 UFC/mL di coliformi (TCC: *Total Coliforms Count*). (26) (28)

Al fine di ridurre al minimo il rischio di contaminazione batterica del colostro durante la raccolta è necessario, in primo luogo, eseguire un'adeguata pulizia e disinfezione del capezzolo. Non è da trascurare però l'attrezzatura impiegata per la raccolta e la somministrazione; la contaminazione del colostro potrebbe derivare anche da questi strumenti. (28) (26)

Gli esperti raccomandano di refrigerare o congelare entro 30-60 minuti dalla raccolta il colostro che non viene somministrato immediatamente. (28) Se refrigerato a 2-4°C deve essere impiegato entro 2-3 giorni dalla mungitura (11); se invece viene congelato, a -18°C o -20°C (11), lo si può conservare fino ad 1 anno. (26) (28) (11) Le basse temperature, infatti, rallentano o bloccano la replicazione batterica, senza danneggiare le IgG, ma non eliminano i patogeni presenti. (9) (28)

Una soluzione per ridurre la contaminazione batterica colostrale, senza danneggiare il contenuto in IgG, potrebbe essere la pastorizzazione (60°C per 60 minuti). (9) (28) Si è visto infatti che, seppure le immunoglobuline siano termolabili, la loro concentrazione colostrale non risente della pastorizzazione con questi valori di temperatura e tempo. Che sono invece utili per ridurre la carica microbica di *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Mycoplasma bovis* e *Mycobacterium avium* subspecie *paratuberculosis*. (9) Bisogna prestare molta attenzione però al trattamento termico del colostro, temperature pari a 75°C per 5 minuti bastano per ridurre il contenuto di IgG del 40%. (12)

In alternativa al trattamento termico vengono suggeriti anche altri metodi, quali l'impiego di pressioni elevate o l'acidificazione, tuttavia entrambi i metodi hanno un impatto negativo sulle immunoglobuline. Inoltre, l'acidificazione riduce la digeribilità del colostro. (11) (12)

Al fine di ottenere una conservazione più duratura del colostro si sono provate anche metodiche di disidratazione, ma si è visto che la composizione chimica e l'assorbimento relativo del vitello di IgG ne risentono negativamente. (11)

La cattiva qualità e gestione del colostro possono quindi avere un impatto negativo notevole sulla salute dei vitelli. È fondamentale rispettare le corrette prassi igienico-sanitarie in fase di mungitura e somministrazione del colostro, nonché, nell'eventuale conservazione. (29)

Una volta munto, il colostro deve essere somministrato al vitello tempestivamente, fornendolo ad una temperatura di 37-38°C. (26) Se si adotta la tecnica del congelamento, è preferibile farlo utilizzando degli appositi sacchetti di plastica e non delle bottiglie, perché queste ultime non permettono un congelamento rapido. Il successivo scongelamento deve avvenire esclusivamente a bagnomaria, ad una temperatura inferiore ai 49°C. (29) (26)

La "banca del colostro" è una pratica molto utile, specialmente per fornire un'adeguata quantità di immunoglobuline a quei vitelli che, per i motivi più disparati, non possono ricevere il colostro dalla madre. Vi deve essere, però, un'attenta selezione delle bovine di cui stoccare il colostro (contenuto in Ig da buono ad alto). Quest'ultimo deve essere poi gestito al meglio da parte dell'allevatore, onde evitare pericolose contaminazioni batteriche. (26)

3 Fisiologia della digestione nel vitello pre-ruminante

I ruminanti hanno un apparato digerente che si distingue da quello dei monogastrici, principalmente, per la presenza di 4 stomaci; nello specifico 3 pre-stomaci e 1 stomaco ghiandolare, che è l'equivalente dello stomaco dei monogastrici. Tuttavia, il vitello alla nascita, e fino a quando non inizierà un'alimentazione solida, si comporta da monogastrico funzionale. Quando consuma il colostro, il latte o loro sostituti in forma liquida, i prestomaci vengono bypassati per mezzo della così detta "doccia esofagea" e l'alimento finisce direttamente nell'abomaso (stomaco ghiandolare dei ruminanti). La doccia esofagea è una sorta di canale che si viene a formare per la contrazione di due labbri che si estendono dal cardias, attraverso i pre-stomaci, fino all'ostio reticolo-omasale, in questo modo l'alimento liquido transita direttamente dall'esofago all'abomaso. [Figura 2] La doccia esofagea si chiude a costituire questo canale grazie ad un riflesso naturale, stimolato da diversi fattori. Fra questi sembra che vi sia l'ingestione del latte, anche se forse, più propriamente, sarebbero le proteine in esso contenute ad evocarlo. Per certo sappiamo che la posizione naturale di suzione che assume il vitello estendendo la testa verso l'alto ha una notevole influenza e si sconsiglia, pertanto, di alimentare i vitelli con la testa piegata in basso. (30) (31) (32)

Da ricorda il fatto che le ghiandole salivari del vitello pre-ruminante sono ancora immature e secernono poca saliva. Questa saliva è priva di enzimi proteolitici e la digestione delle proteine inizia solo nell'abomaso, sotto l'azione delle proteasi gastriche. (32)

Perché la digestione e l'assorbimento dei nutrienti presenti nell'alimento siano efficienti, è necessario che il latte passi attraverso l'intestino nel giusto volume e transiti con la velocità idonea, permettendo così agli enzimi digestivi di agire al meglio sull'alimento e agli enterociti di assorbire i nutrienti. (30) La mucosa ghiandolare dell'abomaso secreta tre peptidasi: rennina (o chimosina), pepsina A e pepsina B. Questi enzimi sono attivi in ambiente acido e precipitano rapidamente

le kappa caseine del latte producendo un coagulo, che permarrà nello stomaco fino a 4 ore dal pasto, tempo necessario per permettere alle stesse idrolasi di scindere parzialmente le proteine e per far sì che l'afflusso di chimo all'intestino sia graduale. (30)

Per le proteine sieriche, contenute nel colostro e nel latte (fra cui le immunoglobuline), il percorso è invece diverso, non subiscono l'azione degli enzimi digestivi gastrici ma passano rapidamente nell'intestino tenue, evitando così la digestione enzimatica e acida dello stomaco e giungendo intatte a livello intestinale. (32) (30) Nel duodeno si riversano i succhi pancreatici, ricchi in tripsina, enzima necessario per scindere ulteriormente le componenti proteiche non digerite completamente a livello gastrico. Tuttavia, nel vitello fino a due giorni di vita le secrezioni pancreatiche sono meno efficienti. (32) Questo insieme di processi digestivi, sommati agli inibitori della tripsina presenti nel colostro, fanno sì che le immunoglobuline del colostro non vengano degradate durante il transito gastroenterico. Possono così esplicare efficientemente la loro attività anticorpale a livello locale enterico; inoltre, possono essere assorbite intatte dagli enterociti, venendo poi trasferite nel circolo ematico del vitello. (32) (30) (4)

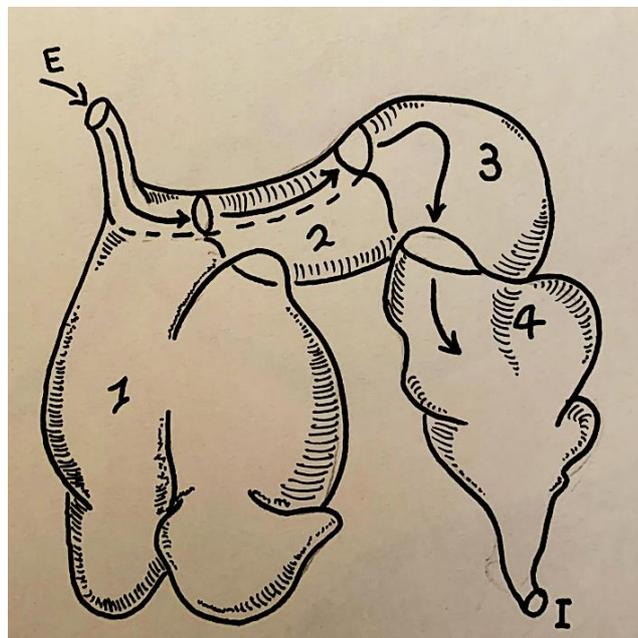


Figura 2 Rappresentazione schematica dei prestomaci nel vitello e del funzionamento della doccia esofagea. Alla lettera E ritroviamo l'esofago poi, seguendo la direzione delle frecce, il Rumine (1), il Reticolo (2) e l'Omaso (3), che vengono bypassati. In fine al numero 4 ritroviamo l'Abomaso e, alla lettera I, il proseguimento nell'intestino tenue. (Disegno personale).

4 Assorbimento delle immunoglobuline a livello intestinale

Il piccolo intestino dei mammiferi neonati viene descritto in letteratura come un “sistema fagocitario”, con la capacità di ingerire macromolecole per mezzo di un meccanismo attivo di endocitosi, definito “pinocitosi”. Nello specifico, T. E. Staley e L. J. Bush riportano che siano le porzioni più distali di piccolo intestino a possedere la maggior capacità assorbente nei confronti delle immunoglobuline (33) (27)

Il meccanismo attraverso il quale le Ig colostrali passano dal lume intestinale al torrente circolatorio del vitello è il seguente:

- 1° Pinocitosi: sulla superficie degli enterociti del piccolo intestino sono presenti dei recettori specifici per la porzione Fc delle Ig (FcR) che le legano. L’optimum per avere questo legame è raggiunto quando il pH è compreso fra 6 e 6,5 (33). La membrana cellulare si invagina a questo livello formando una vescicola intracellulare, contenente le immunoglobuline legate, che viene trasportata attraverso il citoplasma dell’enterocita. (4) (33)
- 2° Esocitosi: una volta che la vescicola è giunta a livello di membrana baso-laterale si fonde con essa, qui il pH raggiunge valori vicini al 7,4 (33), il legame FcR-Ig perde di stabilità e l’immunoglobulina viene rilasciata nella lamina propria. Il recettore verrà invece riciclato e tornerà a livello di membrana cellulare apicale, pronto per legare altre immunoglobuline. (33) (12)
- 3° Passaggio nei vasi linfatici: una volta che le immunoglobuline sono rilasciate per esocitosi a livello subcellulare, si spostano nei vasi linfatici locali. (27) (10)
- 4° Trasferimento al circolo ematico: a livello di dotto toracico assistiamo poi ad una migrazione delle immunoglobuline dalla circolazione linfatica a quella ematica. (10) (9)

La permeabilità intestinale agli anticorpi colostrali è diversa a seconda della specie; in letteratura si riporta che per i ruminanti, a differenza delle altre specie, l'assorbimento non sia selettivo e la mucosa intestinale sia permeabile a tutti gli isotipi anticorpali, oltre ad anche altre macromolecole di natura proteica. Sono però le IgG la classe che viene riscontrata principalmente a livello ematico, questo perché parte delle IgA assorbite vengono progressivamente riescrete; per le IgM sembrerebbe invece che esse siano assorbite più lentamente e tardivamente rispetto alle prime due. Si è visto, inoltre, che nel lume intestinale sono presenti diversi pezzi secretori liberi, che si legano alle IgA e alle IgM e ne inibiscono l'assorbimento. (4) (5) (12) (33) (34)

In linea generale il massimo assorbimento di immunoglobuline lo si ha entro le 4-6 ore dalla nascita, con una graduale perdita nella capacità di assorbire macromolecole da parte del piccolo intestino. (9) Attorno alle 24-36 ore dalla nascita la capacità degli enterociti del piccolo intestino di assorbire macromolecole cessa; questo fenomeno prende il nome di "chiusura". (5)

Gli aspetti che portano alla cessazione nella capacità assorbente, nei confronti delle macromolecole, da parte degli enterociti sembrano molteplici. Assistiamo in primo luogo ad una maturazione della mucosa intestinale, con un ricambio (meglio conosciuto con il termine inglese "*turnover*") degli enterociti che porta alla progressiva perdita di espressione dei recettori indispensabili per attuare la pinocitosi delle macromolecole. Ma non solo, negli enterociti maturi l'apparato di Golgi produce vacuoli contenenti enzimi digestivi; questi lisosomi si fondono con le vescicole provenienti dall'apice della cellula e degradano le macromolecole in esse contenute, fra cui le immunoglobuline. (33) (27) (4)

Va considerato inoltre che, non solo la mucosa intestinale ma tutto l'apparato gastroenterico del neonato iniziano a maturare rapidamente, pertanto, a partire già da 12 ore (27) dalla nascita, la secrezione di enzimi diviene più marcata, con conseguente digestione enzimatica anche delle immunoglobuline. (27) (33)

Un ultimo aspetto da considerare è il fatto che il lume intestinale del neonato è sterile alla nascita, ma, fisiologicamente, si assiste alla progressiva colonizzazione dell'intestino da parte di diversi microrganismi che ne andranno a costituire la microflora. Anche se questi batteri sono "buoni", la loro attività litica non discrimina le immunoglobuline dalle altre molecole, pertanto le degradano ed esse non sono più funzionanti e assorbibili da parte degli enterociti. (33) (27)

5 Fattori influenzanti il trasferimento dell'immunità passiva colostrale

Per ottenere un adeguato trasferimento dell'immunità passiva bisogna prestare attenzione a vari aspetti, che possiamo raggruppare sotto 4 punti:

1. Qualità del colostro: come detto in precedenza, un colostro per essere definito di "buona qualità" deve avere un contenuto in IgG > 50 mg/mL (10) (26).
2. Tempistica di somministrazione: si deve somministrare il colostro fin tanto che gli enterociti sono in grado di assorbire macromolecole intatte. (10) (35)
3. Quantità di colostro: il vitello deve assumere un'adeguata quantità di colostro, affinché l'ammontare di Ig assorbite a livello sistemico sia pari almeno a 10 g di anticorpi per litro di sangue. (29)
4. Salute del vitello e relativa efficienza nell'assorbimento immuoglobulinico intestinale (10) (14)

Parlando del colostro abbiamo già trattato alcuni fattori intrinseci che possono incidere fortemente, di seguito andremo ad affrontarne altri, non legati solamente al colostro, ma anche alla sua gestione e al vitello stesso.

Alcuni autori rilevano titoli anticorpali maggiori nei vitelli di razze da latte di sesso femminile rispetto ai maschi, ma questo è più un fattore umano che non un vero elemento discriminante di natura biologica. Questo perché, negli allevamenti di bovini da latte capita che si ponga maggior attenzione alla colostratura delle femmine, a cui viene destinato colostro di qualità e che viene somministrato con maggior accortezza. Il motivo è che le vitelle costituiranno la rimonta aziendale e saranno la vera fonte di guadagno in futuro per l'azienda. I maschi, invece, vengono venduti per essere allevati come vitelloni a carne bianca e, dato il ridotto valore economico, non sono di interesse per l'allevatore. (5)

5.1 Tempistica di somministrazione del colostro

La tempistica con la quale viene somministrato il colostro al vitello neonato è considerata il maggior fattore limitante un adeguato assorbimento anticorpale. (27)

Nelle prime ore di vita è presente una ridotta attività proteolitica enterica, nonché un'elevata presenza di recettori sugli enterociti, a cui si legano le IgG colostrali e che ne consentono il trasferimento al circolo sistemico. (10) Gli anticorpi devono essere trasferiti prima della "chiusura" della barriera intestinale, che si verifica attorno alle 24 ore dalla nascita. (5)

Dal momento che con la progressiva maturazione del tratto gastro-enterico del neonato l'efficienza con la quale è in grado di assorbire immunoglobuline intatte va via via diminuendo, se si somministra il colostro tardivamente le Ig non attraverseranno la barriera intestinale, rimanendo nel lume enterico. I titoli anticorpali sierici saranno quindi inadeguati, con una conseguente suscettibilità maggiore alle malattie infettive a carattere sistemico. (10) (27) (19) (9)

Si sono fatti diversi studi sul declino nella capacità assorbente del piccolo intestino del vitello, la teoria più accreditata è che la "chiusura" segua un andamento curvilineo [Grafico 1]. (27) La massima efficienza nel trasferimento di Ig al circolo sistemico la si ha entro le prime 4 ore di vita; dopo le 6 ore si assiste già ad un notevole declino, con un'efficienza nell'assorbimento di poco superiore al 65% e diviene inferiore al 50% dopo le 12 ore di vita [Tabella 4]. (29) Per questo motivo gli allevatori dovrebbero somministrare il primo pasto di colostro entro massimo 6 ore dalla nascita. (29)

Alcuni studi hanno stimato che la "chiusura" avvenga in un lasso di tempo compreso fra le 24-30 ore di vita; si è visto però che ritardare il primo pasto di colostro pospone leggermente il fenomeno a 36 ore. (34) (9) Tuttavia, a parità di colostro, i vitelli alimentati precocemente hanno livelli sierici di IgG notevolmente superiori rispetto a quelli che vedono un ritardo nella prima poppata. (19) Inoltre, una precoce somministrazione del colostro previene, o almeno limita, la colonizzazione del lume intestinale da parte di microrganismi patogeni, quali *E. coli*, che potrebbero

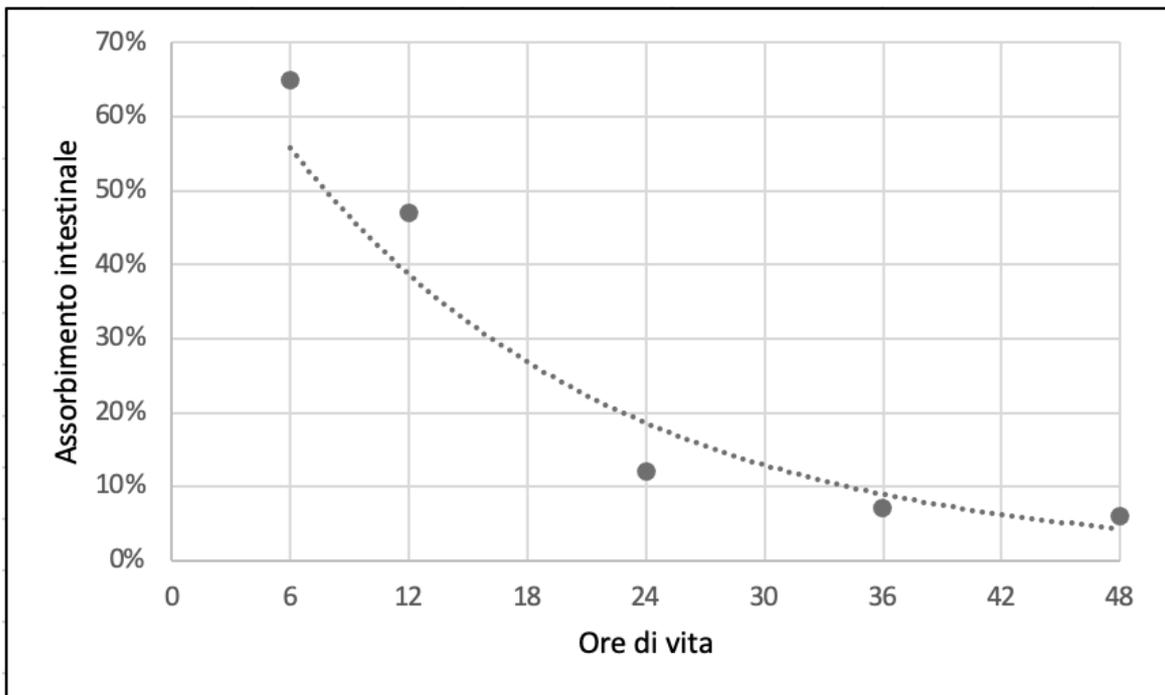
approfittare di questa situazione di barriera intestinale “aperta” per penetrare facilmente nel torrente circolatorio, dando setticemia. (34)

J. D. Quigley riporta di uno studio condotto alimentando diversi vitelli con prodotti simili. Dai risultati sembrerebbe sussistere una differenza sostanziale nel tasso di assorbimento intestinale fra vitelli di diverse razze, suggerendo che quelli di razza Jersey, rispetto a quelli di razza Holstein, abbiano una capacità d'assorbimento maggiore. Tuttavia, le ricerche in merito non sono sufficienti per affermare con certezza che l'*up-take* intestinale delle Ig possa essere influenzato dalla genetica del vitello. (27)

Tabella 4 Effetto della tempistica nell'assunzione del colostro da parte del vitello neonato sul tasso di assorbimento intestinale di immunoglobuline. Tabella tratta dagli articoli di Chiara Spelta (26) e Adriano Del Fabbro (29).

Tempistica di somministrazione (ore dalla nascita)	Assorbimento (%)
6	66
12	47
24	12
36	7
48	6

Grafico 1 Rappresentazione grafica dell'andamento della chiusura intestinale. I dati impiegati per calcolare la curva del grafico provengono dal sito web "Informatore Zootecnico" (29)



5.2 Quantità di colostro somministrato

Gli esperti concordano sul fatto che, per ottenere un'adeguata protezione anticorpale, i vitelli debbano ricevere 100 g di immunoglobuline entro le 6 ore dalla nascita. (26) (19) (9)

Dal momento che il colostro viene considerato di qualità buona quando contiene almeno 50 g/L di immunoglobuline, al fine di fornire al vitello 100 g di Ig, dovrebbero bastare 2 L di colostro. (9) Per i bovini da latte, in realtà, spesso non è così. (9) (10)

Gli esperti affermano che quello che emerge osservando, visivamente, il colostro delle nostre bovine da latte ad alta produzione è che esso tenda ad assomigliare al latte. Il colostro tradizionalmente è denso e di un colore "giallognolo"; ad oggi, però, si vedono sempre più spesso colostri poco densi e opalescenti, che richiamano più il latte nell'aspetto. Si ipotizza che la selezione genetica, attuata sulle bovine da latte al fine di avere montate latte precoci e abbondanti, giochi un ruolo in questo. (10) Selezionando le bovine per produrre sempre più latte si è determinata infatti anche una maggior produzione di colostro; questo ha portato ad avere, però, una diluizione delle Ig. Di fatto, nella sua totalità, il colostro mantiene inalterata la quota di immunoglobuline, ma si riduce la concentrazione per unità di volume. Ne consegue che, a parità di volume di colostro ingerito, il vitello assuma una quota di anticorpi quantitativamente minore. (10)

Al fine di soddisfare l'adeguato ammontare di immunoglobuline che il vitello deve assumere, la quantità di colostro somministrato al primo pasto deve essere quindi aumentata. Se però la selezione genetica ha incrementato la produzione delle bovine da latte, altrettanto non ha fatto con la capacità ingestiva dei vitelli. Si è visto infatti che lasciando poppare i vitelli di razze da latte dalla madre, essi si saziavano ma non assumevano abbastanza immunoglobuline per coprire il fabbisogno anticorpale. (19)

In uno studio condotto su bovine di razza Frisona, solo il 36% del colostro analizzato era di qualità sufficiente per poter colostrare adeguatamente il vitello con 2 L dello stesso. (9) (19) In più articoli si riporta che per raggiungere la copertura anticorpale desiderata, si debba alimentare i vitelli con un ammontare di colostro pari a 4 L (35)

(26), che è all'incirca il 10% del peso vivo di un vitello di razza Frisona neonato. (36) Metà del fabbisogno stimato lo si dovrebbe somministrare entro 6h dalla nascita e i restanti 2 L entro le 12h. (26) L'effetto "diluzione" del colostro avrebbe però raggiunto un'entità tale che nemmeno 4 L di colostro bastino, in certi casi, a fornire al vitello un'immunità passiva adeguata. (37)

Al problema dell'effetto "diluizione colostrale", come è stato definito dal Professore S. Cavirani in un articolo, l'uomo ha posto rimedio alimentando artificialmente i vitelli delle bovine da latte ad elevata produzione con il doppio del colostro che sarebbe necessario se questo fosse di qualità adeguata, ma sussiste comunque un problema. Gli enterociti sono in grado di estrarre con maggior efficienza Ig da un volume ridotto di colostro. (10) (9) (27)

Nei vitelli appena nati, la barriera intestinale non è così selettiva come per i neonati di altre specie e diverse macromolecole proteiche competono per lo stesso processo di assorbimento. Ne consegue che, il quantitativo di immunoglobuline assorbite sia inversamente proporzionale alla concentrazione di macromolecole, non anticorpali, presenti nel lume intestinale. A parità di contenuto immunoglobulinico totale, l'intestino del vitello assorbe con maggior efficienza le IgG presenti in un volume di colostro pari a 1 L, che non se le stesse fossero ridistribuite in 2 L. (27) Il motivo sarebbe proprio da ricercare nel fatto che il processo di assorbimento veda un limite di saturazione dei recettori. (27) (1) (35) (33)

Tutto ciò spiegherebbe il motivo per il quale nelle razze da carne, in cui si fa linea vacca-vitello, l'allattamento diretto del neonato da parte della madre sia efficiente e non si abbia un problema di colostratura inadeguata come si ha, invece, nel caso le bovine da latte allattino direttamente i propri vitelli. Una produzione di ridotti volumi di un colostro di qualità non necessita della somministrazione forzata da parte dell'uomo e l'intestino del vitello ne assimila con maggior efficienza le immunoglobuline. (35) (27) (5)

5.3 Modalità di somministrazione del colostro

La modalità di somministrazione corretta del colostro deve perseguire la chiusura della doccia esofagea del vitello. Come detto nei capitoli precedenti, alla base di questo riflesso vi sono diversi fattori, fondamentale è l'estensione verso l'alto del collo. Va quindi evitata la così detta assunzione dal "secchio", pratica che è comunque ormai in disuso nell'allevamento intensivo. (10)

Le modalità di assunzione del colostro impiegate attualmente sono riconducibili a 3 prassi: assunzione spontanea dalla mammella, somministrazione da bottiglia e ingestione tramite sonda esofagea. (5)

Tradizionalmente si ritiene che la suzione del colostro direttamente dalla mammella rappresenti la metodica migliore e che porti ad un assorbimento ottimale delle immunoglobuline colostrali. Alcuni studi condotti al fine di accreditare detta ipotesi dimostrerebbero che la presenza della madre determini nel piccolo un assorbimento più efficiente di Ig. Detto assunto trova però oggi notevoli limitazioni per quanto concerne le razze da latte, a causa della selezione genetica di cui sono state oggetto le bovine. In primo luogo, torniamo a ribadire quanto detto in precedenza, ovvero che i vitelli a cui è consentito alimentarsi a sazietà dalla madre possono non ingerire un adeguato volume di colostro per soddisfare l'ammontare ritenuto idoneo in immunoglobuline. Altro aspetto da considerare è la conformazione della mammella delle bovine ad alta produzione; le notevoli dimensioni e la conformazione dell'apparato mammario concorrono a sfavorire la suzione diretta da parte del piccolo. Non ultimo il fatto che, la suzione diretta dalla mammella esponga il vitello ad un maggior rischio di ingerire patogeni; cosa che non si verifica nutrendolo artificialmente (sempre che l'addetto adotti le adeguate prassi igienico-sanitarie) (5) (9) (19)

Per quanto riguarda la somministrazione artificiale, invece, le differenze fra sonda e biberon non sono statisticamente e clinicamente rilevanti, anche se in alcuni lavori viene riportata una maggior efficienza nell'assorbimento di Ig da parte dei vitelli alimentati con biberon. (19) (27) La sonda può essere utile in quei vitelli che non succhiano perché deboli, oppure quando il volume di colostro da somministrare è

notevole e il vitello si sazierebbe con meno; inoltre, è sicuramente una metodica più rapida e risparmia all'addetto molto tempo rispetto al biberon. (26) (9)

Gli esperti raccomandano di togliere il vitello dalla madre entro 1 o 2 ore dalla nascita e di alimentarlo artificialmente con la bottiglia o la sonda esofagea, somministrando un adeguato volume di colostro. (9)

Quanto detto trova però un significato parlando delle razze da latte. In uno studio si è visto infatti che, nel caso dei vitelli di razze da carne, la suzione spontanea dalla mammella è molto efficiente. Per contro, circa il 64% dei vitelli di bovine da latte, lasciati succhiare spontaneamente dalla madre per 3 giorni, presentavano un deficit anticorpale. (35) I dati di un altro studio dimostrano che somministrando 3,78 L di colostro di qualità da bovine di razza Holstein, solamente l'85% dei vitelli ricevevano un adeguato trasferimento passivo di Ig. (9) Questi concetti sottolineano ancora una volta il problema della "diluizione colostrale" e la necessità di adottare metodi artificiali di somministrazione del colostro nei vitelli di razze da latte. Problema che non si pone per quelle da carne, nelle quali, data generalmente la maggior qualità del colostro, 3 L (35) dello stesso sono più che sufficienti per immunizzare adeguatamente il vitello. (35) (10)

Indipendentemente dalla modalità di somministrazione del colostro però, la temperatura che esso presenta alla somministrazione deve essere compresa fra i 37-38°C (vicina alla temperatura corporea del vitello), così da consentirne una digestione ottimale. (26)

5.4 Stress

In diversi articoli si parla dello stress quale fattore in grado di influenzare negativamente l'assorbimento di immunoglobuline da parte del vitello. Gli autori affrontano in genere 2 tipologie di stress: il freddo e i parti distocici. (33) (34) (27) (9)

5.4.1 Stress da freddo

In letteratura si riporta che temperature ambientali estremamente rigide, ma non moderatamente basse, possano avere un effetto diretto sull'assorbimento intestinale, portando ad una ridotta assimilazione e trasporto di immunoglobuline dal lume intestinale al circolo sistemico. Inoltre, con temperature al di fuori della zona termo-neutrale del cucciolo, quest'ultimo presenta una ridotta vitalità, raggiunge la stazione quadrupedale con più difficoltà e, di conseguenza, non ha lo stimolo a poppare. (9) (27)

L'unica affermazione che viene realmente fatta, però, è che l'assorbimento di IgG venga ridotto notevolmente solamente in condizioni di freddo estremo (-15°C), mentre con freddi invernali classici non vi sia un risentimento degno di nota. (14) Allo stesso modo anche temperature ambientali elevate in estate incidono negativamente sull'assorbimento immunoglobulinico. (14)

5.4.2 Parti distocici

A causa di parti prolungati il nascituro tenderà a sviluppare acidosi respiratoria o metabolica nell'immediato post-partum. Si è osservato che i vitelli affette da tali alterazioni presentavano anche tassi di immunoglobuline sieriche minori. Tale associazione non troverebbe però supporto da evidenze scientifiche, di fatto si è visto che l'acidosi metabolica non determina alcuna alterazione nell'*up-take* di Ig. La vera spiegazione sta nel fatto che un vitello sottoposto ad un tale stress durante il parto ha una ridotta vitalità, raggiunge la stazione quadrupedale con più difficoltà

e non presenta un riflesso di suzione adeguato; ne consegue che non assumerà adeguatamente il colostro. Ancora una volta, un'assunzione ridotta di colostro si associa ad un deficit nel trasferimento immunoglobulinico. (19) (5)

In vitro si è osservato che il cortisolo ad alte concentrazioni agisce negativamente sulle cellule delle mucose, inibendone il metabolismo. Dal momento che i recettori FcRn per le immunoglobuline vengono costantemente riciclati da parte degli enterociti, se il metabolismo cellulare è soppresso, anche la capacità di riciclare questi recettori viene rallentata. Un rallentamento nel riutilizzo degli FcRn porterebbe quindi ad un minor *up-take* di molecole dal lume intestinale; ed ecco perché il cortisolo, ad elevati livelli, avrebbe un effetto negativo sul trasferimento dell'immunità passiva. (33) (34) (27)

5.5 Dismicrobismi intestinali

Parlando del colostro abbiamo già accennato al fatto che non vi debba essere contaminazione batterica. L'obiettivo è quello di avere un contenuto <100.000 UFC/mL di carica batterica totale e < 10.000 UFC/mL di coliformi. (28)

Se la ghiandola mammaria della bovina è sana, il colostro di per sé non dovrebbe essere contaminato da batteri. Deve essere però gestito al meglio, per evitare contaminazioni dopo la mungitura e prima della somministrazione al vitello. Tuttavia, non bisogna pensare che sia solamente un colostro contaminato una potenziale causa di infezioni e dismicrobismi intestinali nel vitello. Diversi patogeni sono abitualmente presenti nell'ambiente in cui vivono gli animali, gli interventi di biosicurezza nelle sale parto e nella vitellaia sono indispensabili per limitare il rischio di infezione. (26) (28)

Diversi studi hanno dimostrato come la contaminazione batterica del colostro, in particolare da coliformi, abbia un impatto negativo sull'efficienza del trasferimento immunitario. (28)

Riassumiamo brevemente i motivi ed i meccanismi alla base nei due punti seguenti:

- Le immunoglobuline colostrali, ancora libere a livello di lume intestinale, legano i microrganismi e le tossine per i quali sono state selezionate. Ne deriva che, così legate, siano impossibilitate ad interagire con gli FcRn espressi dagli enterociti e non vengano internalizzate dalla mucosa intestinale, con importanti ripercussioni sui titoli sierici del vitello. (33) (12) (9)
- Come è vero che le immunoglobuline legano e neutralizzano Ag potenzialmente patogeni nel lume intestinale, è anche vero che i batteri intestinali possono interagire con esse danneggiandole. Sono stati fatti alcuni studi al riguardo e, come si supponeva, si è visto che gli enzimi prodotti da diversi microrganismi degradano parzialmente le immunoglobuline. Le Ig totalmente o parzialmente digerite da tali enzimi non saranno quindi pienamente funzionanti. (33)

6 FPT, patologie neonatali nel vitello e ricadute sulle produzioni

Come detto nei paragrafi precedenti, la somministrazione del colostro è il metodo per trasferire al vitello un'immunità passiva specifica, ossia anticorpi prodotti dalla madre e diretti contro gli antigeni vaccinali o selvaggi con i quali è entrata in contatto.

(2)

In un articolo il colostro è definito come “la terapia ideale per far crescere sani i vitelli”. (29)

Gli effetti utili di un adeguato assorbimento di immunoglobuline dal colostro, sulla vita e sulla produzione futura del vitello/a (sia che sia candidato a divenire bovino da carne che bovina da latte) possono essere riassunti nei seguenti punti:

- ✓ Protezione verso le diarree neonatali.
- ✓ Minor incidenza di disturbi digestivi.
- ✓ Minor incidenza di disturbi respiratori.
- ✓ Maggior efficienza alimentare, prima e dopo lo svezzamento, con incrementi giornalieri superiori.
- ✓ Maggior produzione di latte in prima e seconda lattazione. (26)

Una condizione di deficit nel trasferimento di IgG viene indicata con il termine FPT (*Failure of Passive Transfer*). Il fallimento del trasferimento dell'immunità passiva non è considerarsi come una vera patologia, ma è uno stato che predispone il neonato a sviluppare malattia, con ripercussioni anche a lungo termine e che incideranno negativamente sulla sua carriera produttiva futura. (5) (26)

Si considera, che la concentrazione soglia di IgG nel siero ematico del vitello, al fine di avere un'immunità passiva funzionale, debba essere di almeno 10 mg/mL nei primi giorni di vita. (1) Pertanto, si definisce in FPT un vitello che presenta un contenuto sierico in Ig inferiore ai 10 mg/mL. (5)

Tamas K. e Richard P. affermano che i vitelli con una concentrazione di IgG sieriche inferiore a tale soglia abbiano il doppio delle probabilità di morire rispetto a quelli con un contenuto sierico più alto. (28) Si stima infatti che circa il 90% dei vitelli che muore nella prima settimana di vita abbia un deficit anticorpale e lo stesso vale per l'80% di quelli che muoiono entro la seconda settimana. (37)

Tuttavia, va considerato che l'FPT è un indice che misura unicamente le IgG presenti in circolo e non quelle in sede enterica. Le immunoglobuline di classe G sieriche sono indispensabili per contrastare le malattie infettive a carattere sistemico, ma la loro utilità nel combattere le infezioni enteriche, che rimangono localizzate, è limitata. Il controllo di queste infezioni è infatti prettamente a carico delle immunoglobuline che rimangono a livello intestinale. Ne consegue che, anche se somministrato tardivamente, il colostro debba essere assunto comunque dai vitelli ed essi dovrebbero continuare a berlo fino a 3 giorni (29) dalla nascita. Così facendo le Ig che rimangono nel lume intestinale svolgono un'attività protettiva locale contro i patogeni enterici. (10) (27) (29)

Sono ancora da definire a pieno i meccanismi che portano alla *clearance* anticorpale dal circolo ma sappiamo per certo che nelle prime due settimane di vita i cuccioli sono proteinurici ed eliminano anche immunoglobuline intatte con le urine. Questo fenomeno è fisiologico e si verifica perché assimilano grandi quantità di proteine con il colostro, a cui si associa anche il fatto che, fisiologicamente, hanno una maggior permeabilità dei glomeruli renali. (4)

Diversi studi, condotti sui vitelli, hanno però messo in luce come la maggior parte delle IgG₁ sieriche vengano ri-escrete a livello intestinale, dove sono state rinvenute quasi il 70% (1) delle immunoglobuline trasferite passivamente. Gli esperti ritengono che questo meccanismo di trasporto inverso abbia un significato immunitario molto importante. La presenza di tali Ig intatte nel lume intestinale nei primi 4-10 giorni di vita (35) fornirebbe infatti un'ulteriore difesa contro le infezioni neonatali da rota- e coronavirus.

Tutto ciò sottolinea, ancora una volta, l'importanza di un trasferimento anticorpale passivo elevato nelle prime 24-36 ore di vita, mediante il colostro materno. (1) (4) (35)

6.1 Diarree neonatali su base infettiva e polmoniti

Le patologie a carico dell'apparato gastro-enterico sono ritenute il problema più frequente nell'allevamento dei vitelli; la loro incidenza è molto variabile e può arrivare anche al 65% nelle prime settimane. L'enterite neonatale è da considerarsi inoltre la prima causa di mortalità neonatale nei bovini da carne e da latte degli Stati Uniti. (38)

Il principale fattore di rischio in grado di favorire l'insorgere di una condizione diarroica è l'insufficiente trasferimento di immunità passiva mediante il colostro. Non è però l'unico, l'enterite neonatale riconosce tutta una serie di fattori favorenti-scatenanti. Accanto ad una mancata o errata colostratura possiamo identificarne anche altri, quali: condizioni climatiche avverse, gestione igienico-sanitaria inadeguata ed un'alimentazione errata. Elemento fondamentale di cui tenere conto nella comparsa di enterite sono poi i microrganismi, i quali sono spesso associati fra loro, determinando così forme patologiche più gravi. (1) (10)

Un recente studio, condotto seguendo alcuni vitelli dalla nascita fino ai 7 giorni di vita, ha dimostrato come il colostro sia un fattore indispensabile per regolare la crescita della microflora intestinale naturale, favorendo anche l'incremento ponderale del vitello. Gli autori affermano: "La conta dei Lattobacilli dipende dalla quantità di immunoglobuline nel colostro" Kamila Puppel et al. (traduzione in italiano del testo inglese) (15). Nello studio, un colostro di maggior qualità, inteso come tenore immunoglobulinico, ha infatti favorito la crescita dei batteri probiotici nell'intestino dei vitelli alimentati con esso, i quali, per altro, hanno mostrato anche incrementi ponderali giornalieri superiori. Si è evidenziata infatti una correlazione negativa fra la crescita dei batteri "buoni" e quella dei potenziali patogeni. Si è visto come la crescita dei Lattobacilli antagonizzasse quella dei Coliformi, così come

quella di *Bifidobacterium* spp contro gli *E. coli*. Un colostro di qualità, quindi, agirebbe anche indirettamente nel contrastare la crescita dei batteri patogeni. Agevolando la crescita dei batteri probiotici si crea infatti una competizione naturale contro i Coliformi e si favorisce lo sviluppo di un microbiota intestinale sano. (15)

Gli agenti causali di diarrea neonatale sono numerosi, gli *E. coli* (patotipo ETEC, EPEC e VTEC) sono considerati fra i più letali, proprio perché colpiscono i vitelli già nei primi giorni di vita. Oltre ad essi dobbiamo però ricordare anche Rotavirus, Coronavirus, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Cryptosporidium parvum* e *Giardia*. (38) (39)

La patogenesi differisce fra batteri, virus e parassiti ma l'esito è comune, il vitello andrà incontro ad uno stato di shock ipovolemico che, se non trattato tempestivamente ed in modo adeguato, ne determinerà la morte. (39)

I batteri sono agenti di diarrea di tipo secretorio; aderiscono agli enterociti e liberano tossine, portando ad un'alterazione delle pompe di membrana, con conseguente secrezione di Cl⁻ e K⁺. Criptosporidi e virus invece causano una diarrea da malassorbimento, osmotica. I virus penetrano negli enterociti e li distruggono; i criptosporidi invece, seppur penetrino sempre negli enterociti, non li distruggono, ma portano "solamente" ad atrofia e fusione dei villi. (39) (38)

Il problema delle enteriti neonatali di natura infettiva, però, non si limita solamente all'intestino del vitello; se particolarmente gravi, il danno intestinale risulta tale da permettere ai patogeni, principalmente batteri, di guadagnare il circolo sistemico. Il superamento della barriera enterica da parte dei patogeni, con conseguente sistemizzazione per via linfo-ematogena e localizzazione in altri distretti organici, fra i quali i polmoni, prende il nome di *microbial translocation*. Ad avvalorare questo concetto si riporta che da alcune necroscopie, condotte su vitelli affetti da forme respiratorie, si sono isolati *Escherichia coli* enteropatogeni. (10)

La forma endotossica da coliformi risulta, generalmente, nel collasso cardiovascolare e nella morte del vitello. Se il vitello vede un FPT solamente parziale potremmo non assistere alla morte del soggetto ma la batteriemia che ne risulta è comunque pericolosa. (37) Ma non solo, potremmo avere anche una maggiore incidenza di artriti settiche, onfaliti e onfaloflebiti. (37)

6.2 Diarrea alimentare

L'enterite neonatale è una problematica complessa, accanto a fattori scatenanti di natura infettiva riconosciamo anche altri elementi, che possono favorire sì l'azione di parassiti, batteri e virus, ma che tal volta sono essi stessi la causa primaria della diarrea nel vitello. In particolare, bisogna prestare attenzione agli errori nutrizionali che portano ad indigestione lattea. I vitelli hanno una capacità ingestiva limitata e si saziano generalmente con volumi ridotti di colostro/latte; somministrare grossi volumi di alimento ad intervalli prolungati è da ritenersi pertanto una pratica sbagliata. (38) (19)

Sandro Cavirani riporta segnalazioni di diarree neonatali precocissime, che comparivano già nelle prime ore di vita, successivamente alla somministrazione del colostro. Tenendo conto delle caratteristiche delle infezioni microbiche, l'insorgenza precocissima di queste forme diarroiche non poteva coincidere con le cause infettive; il tempo necessario ai patogeni per passare dalla fase di irruzione a quella di infezione e malattia clinicamente manifesta è infatti superiore. L'indagine anamnestica ha messo in luce qualcosa di interessante riguardo la provenienza delle segnalazioni, si trattava in prevalenza di allevamenti da latte, destinati alla produzione casearia. Questo ha indirizzato S. Cavirani a pensare che la selezione genetica possa aver portato ad una composizione del latte, destinato alla produzione di formaggi, sostanzialmente differente rispetto a quello selezionato in natura per l'alimentazione del vitello. Il latte destinato alla caseificazione potrebbe, per tanto, risultare indigesto per il vitello, il quale ha però mantenuto intatta la sua fisiologia digestiva. Il tutto esiterebbe in forme diarroiche precoci, indipendenti dal coinvolgimento diretto di patogeni, ma che predisporrebbero però anche ad una successiva azione da parte di microrganismi patogeni, aggravando il quadro. (10)

Come per la diarrea di natura infettiva, anche quella di origine alimentare, in quanto condizione diarroica, porterà il vitello ad avere un mal assorbimento intestinale, esitando in una condizione di FPT. (10)

Concludiamo il discorso con una citazione che riunisce bene tutti i concetti del capitolo: "L'FPT può causare la diarrea ma, per converso, la diarrea può causare l'FPT", S. Cavirani (10).

6.3 Ricadute sulle produzioni e profilassi

S. Cavarani ha condotto uno studio caso-controllo su bovine di razza Frisona in produzione. Delle vacche arruolate metà avevano sofferto di enterite neonatale, la cui entità clinica aveva imposto il ricorso alla terapia antibiotica. I risultati hanno messo in luce come tali animali abbiano presentato un indice di accrescimento e di produzione latte significativamente inferiore rispetto alle bovine controllo che, in età giovanile, non avevano sofferto della stessa problematica. Il danno stimato, in termini produttivi, è stato quantificato essere tra i 350 ed i 450 €/capo. Ad aggravare tale perdita si devono sommare inoltre i costi delle terapie rese necessarie per curare i soggetti malati. (10)

Le perdite economiche dovute a queste problematiche giovanili sono quindi notevoli e riguarderanno tutta la carriera produttiva dell'animale (mortalità giovanile, costo dei trattamenti, calo di produzione e di incremento ponderale). (39)

Data la gravità e la complessa interazione delle patologie neonatali di natura infettiva, la prevenzione dell'enterite nei vitelli neonati deve essere considerata un elemento fondamentale per la gestione sanitaria dell'azienda. Visto e considerato anche il danno economico, da mancate rese produttive, che si protrae negli anni. (5) (10) (39)

Data la problematica, si sono cercate diverse strategie di controllo e gestione. Quella che si è dimostrata essere vincente è la profilassi mediante vaccinazione delle bovine nel periodo di asciutta, al fine di innalzare i livelli di anticorpi specifici nel colostro che assumerà il piccolo. Perché la pratica vaccinale abbia successo è però necessario che il vitello assuma il colostro materno entro le 6 ore dalla nascita e che questo sia quali-quantitativamente adeguato. (5) (10)

7 Trasferimento passivo artificiale

Tal volta gli allevatori, per far fronte al problema di colostri poveri in immunoglobuline, ed evitare di avere numerosi vitelli in FPT, ricorrono a prodotti commerciali. (10)

In vendita possiamo ritrovare:

- Vero colostro bovino: ottenuto da bovine “donatrici” che vengono vaccinate durante l’asciutta e da cui si preleva poi il colostro, il quale verrà trattato termicamente e liofilizzato. (26)
- Sostituti del colostro: prodotti contenenti minimo 100 g di IgG per dose. (9)
- Integratori colostrali: contenenti, in genere, meno di 50 g di IgG per dose (9); una raccomandazione è che devono essere addizionati al colostro materno e non usati come suo sostituto. (9) (26)

I sostituti del colostro e gli integratori colostrali, possono contenere IgY estratte da uova di galline (*Gallus gallus*) iperimmunizzate, oppure IgG bovine derivate dal latte o dal plasma ematico. (9) (27)

I prodotti derivati dal plasma bovino sarebbero da considerarsi i migliori, si è visto infatti che sono significativamente più efficienti nel fornire IgG ai vitelli, anche in virtù del fatto che ne contengono concentrazioni maggiori. Ancora, queste sostanze sono più economiche rispetto alle altre tipologie e il tasso di assorbimento intestinale è paragonabile a quello delle immunoglobuline contenute nel colostro naturale. (27)

Queste sostanze sono però prive di fattori solubili e di linfociti, presenti invece nel colostro materno, e che sono elementi fondamentali per sostenere la risposta immunitaria del piccolo. Bisogna poi ricordare che il colostro è molto importante

anche per gli elementi nutritivi che apporta e di cui queste sostanze, invece, sono povere. (26)

Si sono condotti diversi studi su questi prodotti e, di fatto, non si sono ottenuti risultati abbastanza soddisfacenti da giustificare un loro utilizzo, se non in casi da ritenersi estremi, ovvero quando si sia proprio impossibilitati a somministrare colostro al vitello. Tralasciando per un attimo l'aspetto economico, anche parlando di vero colostro bovino e non di sostituti, la relativa efficacia immunitaria non è paragonabile con quella del colostro materno. Il colostro aziendale ha una specificità verso gli Ag dei patogeni circolanti nell'allevamento che un sostituto non potrà mai avere. Un esempio è per gli anticorpi volti contro *E. coli*, patogeno dotato di una notevole eterogeneità antigenica. Anche vaccinando le bovine "donatrici" con i più comuni ceppi di *E. coli* non si potrà mai avere la certezza di eguagliare a pieno la specificità immunitaria del colostro aziendale. (10) (35) (9)

Nel caso di animali di pregio, un'alternativa a questi prodotti commerciali da somministrare per bocca, potrebbe essere la somministrazione di plasma bovino per via endovenosa (EV) o intraperitoneale (IP). Si potrebbe somministrare anche sangue intero, prelevato da bovine aziendali, tuttavia non sarebbe da preferire al plasma, in quanto i dosaggi di somministrazione dovrebbero essere aumentati. Una raccomandazione è di prestare attenzione al rischio di reazioni trasfusionali; anche se, in letteratura, non sono descritti casi di reazioni avverse alla prima trasfusione. In ultima analisi il plasma sarebbe quindi da preferire e si consiglia di somministrarlo per via EV al dosaggio di 20 mL/Kg. (19)

Queste pratiche, seppur descritte in letteratura, non sono però molto diffuse. Il motivo è da attribuire ad una serie di fattori: sono delicate ed è bene che solo un medico veterinario le metta in pratica, sono dispendiose (in termini di tempo e denaro) e non hanno mostrato vantaggi sufficienti a giustificare un comune impiego. Inoltre, al fine di ottenere la concentrazione anticorpale desiderata si devono trasfondere notevoli volumi. (19) (13)

Gli esperti affermano che, di fronte ad un colostro con una bassa concentrazione di immunoglobuline, i metodi artificiali per implementare le Ig, al fine di ovviare al problema dell'FPT, non siano da ritenersi una valida alternativa. (10)

Cosa che dovrebbero avere, invece, tutte le moderne realtà aziendali di una certa dimensione è la banca del colostro. Questa, però, deve essere gestita adeguatamente dal punto di vista igienico-sanitario, raccogliendo solo colostro di qualità da bovine sane. Si può così avere sempre a disposizione un prodotto, di qualità, per aiutare quei vitelli che non possono essere colostrati adeguatamente dalla madre. (26)

8 Come valutare il trasferimento di immunità passiva

È ormai noto come, nei vitelli, i livelli ematici di anticorpi dipendano, per le prime 2-3 settimane di vita, dal colostro materno. (1)

La vita media degli anticorpi nel torrente circolatorio va dagli undici giorni e mezzo ai sedici (1), con alcune differenze fra i diversi isotipi. Le IgG vedono un lento declino e raggiungono la concentrazione minima attorno al sessantesimo giorno di vita mentre, IgA e IgM hanno un declino più rapido e la loro concentrazione più bassa la si rileva al ventunesimo giorno. (13)

Sulla base delle precedenti evidenze scientifiche si sono messe a punto diverse tecniche per valutare/stimare i livelli ematici di anticorpi trasferiti passivamente. Con l'aiuto di apposite linee guide si può poi stabilire se il vitello abbia raggiunto un trasferimento passivo adeguato o sia in FPT. I vari test differiscono fra loro per velocità, accuratezza dei risultati (intesa come sensibilità e specificità dei test) e, soprattutto, per l'attrezzatura necessaria per eseguirli. Quest'ultimo elemento è di non poca importanza se si pensa alla loro praticità, sia in termini di costi che di attuabilità nella pratica clinica di campo. (1) (19)

Step preliminare, fondamentale per la realizzazione di tutti i test, è la separazione del siero ematico (parte liquida del sangue che, a differenza del plasma, non contiene fibrinogeno) da un prelievo di sangue venoso del vitello da testare. È molto importante tener presente questo primo passaggio, in quanto il fibrinogeno precipita o coagula similmente alle IgG₁, falsando i risultati. In letteratura si riporta di alcuni test per i quali si può impiegare anche sangue intero o plasma ma diversi autori ritengono che siano meno precisi. In alcuni articoli si consiglia inoltre di non impiegare campioni emolitici, in quanto, la presenza di emoglobina, porta ad avere letture falsamente aumentate nella torbidità. (1) (40)

L'affidabilità dei test è da ritenersi maggiore quando sono eseguiti su animali di età compresa fra i 3 (5)-8 (22) giorni di vita; periodo nel quale l'assorbimento intestinale

di immunoglobuline è cessato e i cambiamenti nei livelli anticorpali sierici sono minimi, in quanto il catabolismo delle immunoglobuline materne è ridotto e la produzione endogena delle stesse è ancora molto limitata. (22) (1)

Gli unici test che misurano direttamente la concentrazione di IgG nel siero sono l'immunodiffusione radiale (RID), il metodo immuno-turbidimetrico (TIA), l'ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e l'elettroforesi. Tutti gli altri stimano solamente la concentrazione immunoglobulinica, basandosi sul contenuto in proteine totali, per questo sono metodiche che vengono definite semi-quantitative (1) (41).

In commercio esistono numerosi kit *on-site*, già pronti all'uso, che sono stati sviluppati sulla base delle metodiche di laboratorio che verranno descritte in seguito. In questo modo si possono svolgere analisi sulla copertura anticorpale passiva nella routine aziendale, a costi accettabili, senza dover necessariamente ricorrere a laboratori adeguatamente attrezzati. (9) (5)

È bene ricordare inoltre che i seguenti test se eseguiti su vitelli già malati non sono da ritenersi affidabili, in quanto la disidratazione e le enteropatie proteino-disperdenti influenzano la concentrazione sierica relativa di immunoglobuline. (1) (40)

8.1 Immunodiffusione radiale (RID)

L'immunodiffusione radiale, anche detta tecnica di Mancini, è una delle metodiche di laboratorio più vecchie ma è considerata ancora oggi il *gold-standard* per misurare il contenuto sierico di IgG. (37) (4) Pur essendo molto dispendiosa in termini di tempo e denaro, servono infatti dei laboratori specializzati per eseguirla, è la più specifica nella lettura del contenuto in IgM ed IgG. (37)

La RID si basa sull'interazione fra antigeni e anticorpi che porta alla formazione di un precipitato insolubile. Ai fini della determinazione della concentrazione anticorpale, si impiega un gel di agar in cui si incorporano anticorpi anti-isotipo (anti-IgG nello specifico). Una volta che lo strato di gel si è solidificato vi si ricavano dei

pozzetti, nei quali verrà posto il siero dell'animale di cui determinare il contenuto anticorpale. Gli anticorpi del vitello si comporteranno da antigeni e verranno legati dagli Ab anti-IgG presenti nel gel. Le immunoglobuline sieriche, diffondendo nell'agar, origineranno così degli anelli di precipitazione attorno ai pozzetti, dal diametro proporzionale alla concentrazione anticorpale del vitello. Un software analizza infine i diametri di diffusione e li confronta con una curva standard nota, restituendo la concentrazione anticorpale nel siero. (4)

Dal momento che questa metodica è considerata sicuramente la migliore ma è poco attuabile nella realtà clinica, sono stati sviluppati anche dei test rapidi, basati proprio sul meccanismo alla base della RID. Vengono espresse però perplessità da parte di alcuni autori riguardo alla reale attendibilità dei risultati forniti da questi kit. (13)

8.2 Tecnica immunoturbidimetrica (TIA)

La tecnica immunoturbidimetrica si basa sempre sulla reazione Ag-Ab precedentemente descritta, dove anticorpi anti-IgG legano le IgG sieriche. (4) È un test quantitativo che si è dimostrato molto accurato, inoltre è veloce (bastano 15 minuti (41)) e può essere facilmente impiegato anche in campo. L'unico inconveniente è che si deve acquistare un analizzatore portatile per la lettura del risultato. Il costo della strumentazione necessaria non ne ha quindi favorito la diffusione nella pratica clinica. (41) (13)

8.3 ELISA

È una tecnica immunoenzimatica che consiste nel marcare con un enzima uno dei due reagenti impiegati per il test. Se avviene l'interazione immunologica Ag-Ab si assiste ad una reazione fra enzima (legato ad uno dei due reagenti) e substrato specifico; la reazione enzimatica viene evidenziata aggiungendo una sostanza che cambia colore in presenza di questa interazione. In laboratorio un lettore di densità ottica mette in correlazione l'intensità del viraggio di colore generatosi con il contenuto anticorpale. (4)

L'ELISA è ad oggi una delle metodiche sierologiche più impiegate in campo veterinario e su di essa si basano anche numerosi test rapidi. (4) L'accuratezza di questa tecnica nel rilevare le IgG sieriche è molto simile alla RID ($r^2 = 0,97$ (41)), è rapida (bastano 15-20 minuti (4)) e i costi sono limitati. (41) (4)

I test rapidi che si basano sull'ELISA si adattano bene alla pratica clinica di campo per il rilevamento dei vitelli in FPT. È stato visto però che, con il *cutoff* (anche detto "valore soglia" in italiano) a 10 g/L, il valore predittivo positivo varia dal 71 all'88%, che è inferiore ad altre metodiche, quali: test di precipitazione in sodio solfito, test di torbidità con solfato di zinco e test di coagulazione con glutaraldeide. Gli autori dell'articolo concludono affermando che i test rapidi che sfruttano la metodica ELISA possa essere impiegati come esame di *screening* e conferma solamente per vitelli con concentrazioni anticorpali inferiori a 5 g/L (completo FPT). Mentre sia da considerarsi solamente una metodica di *screening* per quei soggetti che presentano titoli anticorpali pari o superiori ai 5 g/L. (41)

8.4 Immunomigrazione rapida o test a flusso laterale

Altra tecnica immunoenzimatica come l'ELISA è l'immunomigrazione rapida, che in inglese viene definita *lateral flow test* e che in italiano possiamo tradurre letteralmente in "test a flusso laterale". Nella pratica clinica è molto diffuso come test rapido per le malattie infettive ma è stato messo a punto anche un kit *on-site* per l'FPT. È molto simile ad un kit *on-site* ELISA, gli anticorpi del vitello fungono sempre da Ag, mentre gli Ab anti-IgG sono marcati con oro colloidale o selenio colloidale. Gli immunocomplessi che si vengono a formare migrano lungo una membrana porosa, fino alla zona di rilevamento. Punto nel quale gli immunocomplessi vengono catturati e danno origine ad una linea colorata in caso di positività. (4)

Come anche altri test rapidi di questo genere però ha un forte limite, può restituire solamente un valore positivo o negativo. (13) (9) Per cui, misura sì direttamente il contenuto in IgG, ma indica solo se un vitello sia in FPT o abbia concentrazioni anticorpali sufficienti (*cutoff* stabilito a 10 g/L), non fornisce alcuna stima della reale concentrazione anticorpale. (9) (13)

8.5 Elettroforesi

L'elettroforesi è una metodica di laboratorio che permette di separare le diverse proteine sieriche in base al loro peso molecolare ed alla loro carica elettrica. Facendo migrare, per mezzo di un campo elettrico, le proteine lungo il supporto (per esempio agar-gel) si viene a creare un tracciato con dei picchi, che corrispondono ai diversi gruppi di proteine sieriche. Una macchina legge il tracciato e restituisce le concentrazioni delle varie componenti proteiche nel siero. Si possono così quantificare i livelli delle singole classi anticorpali in modo separato. (4) (37)

È sicuramente una tecnica molto accurata ma serve un appoggio ad un laboratorio che disponga delle attrezzature necessarie per eseguirla. Si devono quindi inviare i campioni al laboratorio e si devono attendere 8-12 ore per gli esiti. (37)

8.6 Rifrattometro

Il rifrattometro è sicuramente uno strumento di facile utilizzo in campo e rapido; la procedura per l'analisi è la stessa del rifrattometro per colostro, si pone semplicemente una goccia di siero del vitello sullo strumento e quest'ultimo restituirà la concentrazione in soluti totali. (9) Il problema della metodica rifrattometrica è che numerosi fattori influenzano il valore restituito dallo strumento, in primo luogo la temperatura ambientale. Per tanto, gli esperti consigliano di acquistare un rifrattometro a compensazione automatica della temperatura. (22)

La metodica rifrattometrica si basa sull'assunto secondo il quale le variazioni nel contenuto proteico totale, a livello sierico, siano direttamente correlate a quelle nel contenuto immunoglobulinico. Pur essendo vero che il vitello assimila grandi quantità di immunoglobuline dal colostro, non si può affermare che le variazioni nella componente proteica totale siano da ritenersi correlate solamente al contenuto anticorpale. Oltre alla temperatura, altri elementi che possono influenzare una maggiore o minore concentrazione in solidi totali alla lettura rifrattometrica sono le albumine sieriche, lo stato di idratazione dell'animale (attenzione ai vitelli disidratati in corso di enterite neonatale) e anche l'età. (40) (19) Una dimostrazione di questo è il fatto che negli articoli non si riporta un chiaro valore soglia al di sotto del quale

gli animali siano da considerarsi in FPT. Una concentrazione in proteine sieriche totali pari a 5,0 g/dL è caratterizzata da un'elevata specificità (0,96) ma bassa sensibilità (che è solamente di 0,59). (22) (19) In caso, invece, di concentrazioni sieriche pari a 5,5 g/dL la specificità diminuisce enormemente, scendendo a 0,74, mentre la sensibilità sale a 0,94. (19)

Si è visto infatti che, un vitello sano con una concentrazione anticorpale di 1.000 mg/dL, possa restituire alla lettura rifrattometrica un valore, in solidi totali, pari a 5,2 g/dL. Secondo quanto detto in precedenza, se fissassimo il *cutoff* a 5,5 g/dL lo classificheremmo, però, come FPT. (19) Per massimizzare la specificità del test, e non rischiare di classificare come falso positivo un vitello sano, si dovrebbe fissare il *cutoff* a 5,0 g/dL. Tuttavia, designando come FPT solo i vitelli al di sotto di tale soglia, diminuisce la sensibilità del test e aumenta la probabilità di catalogare un vitello con *failure of passive transfer* come falso negativo, ovvero non FPT. (19)

Possiamo quindi concludere che, pur essendo pratico, in quanto rapido e non necessitando di particolare formazione e strumentazione specialistica, il test rifrattometrico non sia da ritenersi affidabile sul singolo campione quanto le altre metodiche semi-quantitative. L'impossibilità di avere un chiaro *cutoff*, caratterizzato sia da sensibilità che specificità elevate, fa del rifrattometro uno strumento non sufficientemente attendibile per investigare con precisione la concentrazione anticorpale sierica del singolo individuo. Se si vuole eseguire però, direttamente in campo, un rapido e, tutto sommato, economico *screening* della popolazione, per farsi un'idea della percentuale di vitelli in FPT, può andare bene. (19)

Gli esperti danno pareri leggermente discordanti, ma si può ritenere che la colostratura dei vitelli sia adeguata se almeno l'80-90% della rimonta restituisce una lettura al rifrattometro superiore ai *cutoff* stabiliti (5,5 o 5,0 g/dL rispettivamente) (9) Nello specifico si dovrebbe fissare il *cutoff* a 5,5 g/dL se di fronte a vitelli con chiari segni di malattia clinica (per l'inconveniente legato alla disidratazione). Nel caso invece di vitelli apparentemente sani e ben idratati sarebbe meglio fissare il *cutoff* a 5,2 g/dL. (19)

8.7 Attività della GGT sierica

La gamma-glutamyl transferasi (GGT) è un enzima che viene prodotto dalle cellule del dotto galattoforo della ghiandola mammaria. Data la sede di produzione la possiamo ritrovare nel colostro e, di conseguenza, un vitello che assume colostro dalla madre assimila anche la GGT. Nei vitelli si sono evidenziati livelli sierici di GGT significativamente aumentati poco dopo il pasto di colostro, con una repentina diminuzione nelle 24 ore successive. Si è quindi concluso che l'attività sierica di tale enzima, significativamente maggiore nei vitelli neonati, sia conseguente all'assunzione del colostro. (19) (9)

In letteratura si riporta di alcuni studi condotti per cercare una correlazione fra l'attività della GGT nel siero ematico del vitello e immunità passiva colostrale. Di fatto, vi è una correlazione fra l'attività della GGT ed il contenuto immunoglobulinico nel neonato ma non è possibile determinare accuratamente la concentrazione delle IgG circolanti sulla base di essa. L'unica cosa che si può fare è capire se il vitello abbia assunto il colostro materno. Uno studio propone una scala di lettura per poter stabilire se il vitello sia o meno in uno stato di FPT, sulla base dell'attività della GGT rilevata; vengono impiegati vari *cutoff*, stabiliti in ragione dell'età dell'animale. (19)

D. M. Weaver et al. affermano che l'impiego di questo test per determinare lo stato di FPT nei vitelli non presenti dei vantaggi tali da preferirlo alle altre metodiche, pertanto lo sconsigliano. (19)

8.8 Test di coagulazione con glutaraldeide

Il test di coagulazione con glutaraldeide (GCT) era stato studiato inizialmente per rilevare stati infiammatori nei bovini adulti, basandosi su di un prelievo di sangue intero. La glutaraldeide lega, mediante legame covalente, i gruppi amminici liberi delle IgG circolanti, in questo modo si viene a formare un coagulo visibile se l'animale presenta ipergammaglobulinemia (indice di uno stato infiammatorio). (19)

Il problema dell'impiego di questa metodica sul sangue intero è che il fibrinogeno può interferire, favorendo la reazione di coagulazione e falsando così il risultato. Al

fine di testare i livelli sierici di immunoglobuline G nei vitelli neonati, con maggior precisione, si è modificato quindi il test, non applicandolo più sul sangue intero ma semplicemente sul siero. (19)

F. M. Hopkins et al., per l'esecuzione del test, riportano che si debbano mescolare 0,5 mL del siero del vitello con 50 µL di soluzione di glutaraldeide al 10%, lasciando riposare la miscela per 1 ora nella provetta. In caso di reazione positiva, dopo 1 ora si osserva la formazione, sul fondo della provetta, di un coagulo compatto di colore giallo opaco, che non si sposta neanche capovolgendo la provetta. La reazione sopra descritta è indice di un livello sierico immunoglobulinico superiore ai 600 mg/dL. Una reazione presente ma incompleta, ovvero caratterizzata da un coagulo non ben consistente, è invece indice di livelli anticorpali compresi fra 400-600 mg/dL. In ultimo, è da ritenersi negativo un test che non presenta una reazione di coagulazione in presenza della glutaraldeide; il livello sierico di immunoglobuline è, in questo caso, inferiore a 400 mg/dL. (40)

Dal momento che in presenza di un contenuto immunoglobulinico superiore a 600 mg/dL il test risulta sempre positivo, la capacità effettiva di questa metodica di determinare se i vitelli abbiano livelli anticorpali protettivi (>1.000 mg/dL (1)) è discutibile. (40) (1) Si può però affermare che il GCT sia utile per l'identificazione dei soggetti in un completo stato di FPT e di quanto esso sia grave. (40)

8.9 Test di torbidità con solfato di zinco

Il test di torbidità con solfato di zinco era stato ideato inizialmente per la lettura con spettrofotometro ma è stato poi modificato così da renderlo più pratico e non necessitare di strumentazione eccessivamente specialistica per la lettura. È un test che prevede una singola diluizione; viene eseguito aggiungendo 0,1 mL di siero del vitello da testare a 6 mL di una soluzione di solfato di zinco alla concentrazione di 208 mg/L. (19) (22) Alcuni autori consigliano di incubare la soluzione così ottenuta in provetta a 23°C per 1 ora (22), altri invece parlano di tenerla a temperatura ambiente per 30 minuti (19). Durante l'incubazione il solfato di zinco reagisce con le IgG1 determinandone la precipitazione che, visivamente, appare come un

intorbidimento della soluzione in provetta. Il grado di intorbidimento della soluzione in provetta è direttamente correlato con il contenuto anticorpale nel siero testato. In caso di determinazione della torbidità ad occhio, senza l'ausilio di uno spettrofotometro, gli autori consigliano di porre un foglio scritto dietro alla provetta e di far eseguire la lettura sempre allo stesso operatore, così da limitare il fattore umano quale fonte di errore. Il contenuto anticorpale nel siero testato è da ritenersi sufficiente se il foglio non è leggibile attraverso la provetta contenente la soluzione. Ovvero, il trasferimento dell'immunità passiva è avvenuto correttamente. (40) (22) (19)

Questa metodica diagnostica presenta però alcuni inconvenienti. Il primo è che a queste concentrazioni il test, pur avendo una sensibilità del 100%, dimostra una bassa specificità (52%) e permette di classificare adeguatamente solo il 69% dei vitelli testati. In un articolo si consiglia quindi di aumentare la concentrazione della soluzione di solfato di zinco a 350 mg/L, tuttavia altri autori non sembrano tenere in considerazione questa diluizione. (19) Il secondo problema è che la soluzione reagisce con la CO₂, determinando lo sviluppo di una patina che porta ad una lettura falsamente positiva alla reazione di torbidità. Di conseguenza, è facile classificare come adeguatamente protetti, data la torbidità sviluppatasi in provetta, anche vitelli che in realtà non hanno una concentrazione anticorpale adeguata. Per ovviare a questo inconveniente si consiglia, in primis, di prepararla sciogliendo il solfato di zinco nell'acqua distillata mentre viene fatta bollire per una quindicina di minuti, così da rimuovere la CO₂. (19) Altro accorgimento da adottare è quello di conservare la soluzione in atmosfera controllata a bassa CO₂, altrimenti non la si può stoccare per più di una settimana dalla preparazione. (19) (40) In ultimo si ricorda che l'impiego di sieri emolitici porta ad effettuare letture falsamente aumentate nella torbidità; tuttavia, quest'ultimo è un inconveniente che non riguarda solamente suddetta metodica. (40) (19)

In conclusione, il test di torbidità con solfato di zinco dimostra avere una notevole sensibilità, permettendo di identificare con precisione assoluta i vitelli con concentrazioni sieriche di IgG₁ inferiori ai 1.000 mg/dL. La bassa specificità fa sì, però, che all'incirca la metà dei vitelli che presentano una copertura anticorpale da ritenersi comunque sufficiente venga falsamente catalogata come in FPT. (22)

Dal momento che diversi autori concordano sul fatto che solo il 69% dei vitelli, mediamente, sia catalogato adeguatamente, ed alla luce delle problematiche legate all'instabilità della soluzione in presenza di CO₂, il test di torbidità con solfato di zinco non sarebbe una metodica da consigliarsi nell'impiego routinario. (22) (19)

8.10 Test di precipitazione in sodio solfito

Il test di precipitazione in sodio solfito è una metodica diagnostica che, similmente alla precedente, in caso di reazione positiva vede lo sviluppo di un precipitato bianco all'interno della provetta per le analisi. (19) (40) Il sodio solfito reagisce a contatto con le proteine sieriche ad alto peso molecolare, fra cui anche le immunoglobuline, portando ad una precipitazione selettiva delle stesse. La reazione di precipitazione risulta visibile ad occhio come un intorbidimento bianco fumoso della soluzione; questo è il punto di riferimento che l'operatore deve considerare nel valutare il risultato della prova. (19)

È una metodica semi-quantitativa che prevede l'impiego di 3 soluzioni a diversa concentrazione di sodio solfito 1,3 molare (5): 14, 16 e 18%. (19) Per analizzare un campione di siero si preparano quindi 3 provette contenenti, ciascuna, 1,9 mL di una soluzione di sodio solfito. Una provetta conterrà la soluzione di sodio solfito al 14%, un'altra quella al 16% e, in fine, l'ultima quella al 18%. A ciascuna provetta si vanno ad aggiungere 0,1 mL di siero prelevato dal vitello; si mescola poi il contenuto della provetta e lo si lascia reagire per 15 minuti a 23°C. (22)

All'aumentare della concentrazione del sale in soluzione si svilupperà torbidità con concentrazioni proteiche via via minori. Ne risulta che, lo sviluppo di torbidità nella soluzione al 14% sia indice di concentrazioni anticorpali maggiori che non un'equivalente reazione nella soluzione al 16% e, in modo ancora più marcato, in quella al 18%. (19)

Per facilitare l'interpretazione dei dati si consiglia di far svolgere la lettura sempre allo stesso operatore e di porre un foglio di giornale dietro alla provetta. Quando il foglio non è leggibile attraverso la provetta si ha una reazione positiva. (22)

In letteratura vengono riportati due metodi per catalogare gli esiti della prova, il concetto di base è però lo stesso. Il primo prevede che in base al numero di provette nelle quali si sviluppa torbidità si attribuisca un punteggio al siero, da 0 (assenza di torbidità a tutte e 3 le concentrazioni di sodio solfito) a 3+ (reazione positiva in tutte le provette). Nello specifico si attribuisce un 1+ se si sviluppa torbidità solo nella soluzione al 18%, 2+ se vi è reazione positiva anche nella soluzione al 16% e, infine, 3+ in caso di torbidità con tutte e 3 le concentrazioni. (22)

Hopkins et al. impiegano invece la dicitura “+” in caso di torbidità, “-” in caso di assenza e “+/-” in caso di sviluppo di torbidità moderata. Non danno uno score complessivo al campione ma riportano i valori di torbidità in una tabella a tre colonne, una per ciascuna concentrazione di reagente (40)

Diversi autori riconoscono nella soluzione di sodio solfito al 18% la miglior concentrazione per testare i vitelli in campo e verificare se siano in FPT (soluzione limpida) o meno (intorbidimento evidente della soluzione). Si sarebbe visto infatti che l'*endpoint* 1+ classifica correttamente l'86% dei campioni. (19) (22) Tale concentrazione ha una specificità (probabilità che si sviluppi un intorbidimento adeguato della soluzione, con un soggetto dal titolo anticorpale considerato protettivo) pari a 0,87, contro lo 0,56 e lo 0,03 di quelle al 16% ed al 14% rispettivamente. Per contro, la soluzione di sodio solfito al 18% ha una sensibilità (probabilità che un titolo anticorpale considerato non protettivo non generi una reazione di precipitazione ed il soggetto venga pertanto catalogato come FPT) inferiore (0,85) contro l'1,00 delle altre due. (22) Quanto detto è giustificato dal fatto che al ridursi della concentrazione del sale di Na₂SO₃ servono titoli anticorpali via via maggiori, affinché la reazione di precipitazione possa far intorbidire adeguatamente la soluzione in provetta. (19) Se si impiegano tutte e 3 le diluizioni non si valuta solamente se il vitello sia in FPT o meno ma anche se possiede titoli anticorpali più o meno elevati, che sono al di sopra del valore soglia. In uno studio, si sarebbe visto infatti che la concentrazione sierica media di IgG1 che è necessaria per far sviluppare torbidità alle diverse concentrazioni del sale sia pari a 1.250 mg/dL per la concentrazione al 18%, 2.166 mg/dL per quella al 16% e 2.948 mg/dL in caso si sviluppi torbidità a tutte e 3 le concentrazioni (22) Le concentrazioni in Ig

sieriche necessarie per far sviluppare torbidità con le soluzioni al 14 ed al 16% sarebbero quindi molto elevate e verrebbero raggiunte difficilmente dai vitelli delle razze bovine da latte. In uno studio condotto su vitelli di tali razze, solo il 2% dei soggetti testati ha fatto registrare torbidità con il sodio solfito alla più bassa concentrazione (14%) e solamente il 37% con quella intermedia (16%). (19)

In letteratura si riporta anche di un kit *on-site* che si basa proprio sulla metodica con sodio solfito. (37)

In conclusione, il test di precipitazione in sodio solfito viene ritenuto il migliore da impiegare in campo, se lo si raffronta con la metodica rifrattometrica, il test di torbidità con solfato di zinco e quello di coagulazione con glutaraldeide. (22) (40) È infatti poco costoso, facile da eseguire e fornisce una stima accurata dei livelli anticorpali. (40) Le metodiche RID, TIA ed ELISA se realizzate dai laboratori specializzati sono sicuramente più accurate nel fornire gli esatti livelli anticorpali ma sono anche più dispendiose in termini di tempo e denaro e quindi mal si adattano ad un controllo routinario della vitellaia. (9)

Nella pratica clinica di campo l'obiettivo è, generalmente, avere un'idea della percentuale dei vitelli in FPT in azienda. Per tanto si consiglia di analizzare un minimo di 12 soggetti, che siano clinicamente sani e abbiano un'età compresa fra le 24 ore di vita e i 7 giorni, così da avere una stima che sia la più accurata possibile. (9)

9 Razze bovine

Per esprimere il concetto di “razza”, in modo chiaro e completo, citiamo il vocabolario Treccani: “In biologia, popolazione o insieme di popolazioni di una specie che condividono caratteristiche morfologiche, genetiche, ecologiche o fisiologiche differenti da quelle di altre popolazioni della stessa specie. L’esistenza di razze di una specie è indice della presenza di fenomeni di divergenza intraspecifica, spesso determinati da isolamento geografico prolungato nel tempo... *omissis*... In zootecnia e agronomia, categoria di animali domestici o di piante che comprende gli individui in cui, tramite selezione artificiale, sono stati fissati caratteri ereditari (o combinazioni di essi), tali per cui risultino espresse nel fenotipo le volute caratteristiche produttive, estetiche o di altro tipo”. (42)

In ambito zootecnico le razze bovine vengono notoriamente classificate in base all’attitudine produttiva: “da latte”, “da carne” e “a duplice attitudine” (latte e carne). Ad oggi nel nostro paese l’attitudine “lavoro” non è più ormai di interesse economico, per cui non vi sono razze italiane definite ancora a triplice attitudine come un tempo (latte-carne-lavoro). (36) (43)

Negli ultimi 50 anni le razze bovine cosmopolite a spiccata attitudine “da latte” o “da carne” hanno preso il sopravvento negli allevamenti italiani, sostituendo le razze autoctone poiché considerate meno produttive. In particolare, sono le razze nostrane con vocazione alla produzione latte ad aver subito una maggiore contrazione. Nonostante la drastica riduzione numerica, però, ancora sopravvivono e vengono allevate. Anche se, in certi casi i capi sono in numero così limitato e la consanguineità talmente elevata da non far ben sperare per la sopravvivenza futura della razza. La salvaguardia di queste popolazioni minori è da ritenersi però molto importante in un’ottica di allevamenti sostenibili e di variabilità genetica. Molto spesso questi animali presentano caratteristiche di rusticità, legate ad un adattamento all’habitat, e di specifiche caratteristiche qualitative nelle produzioni, dovute al loro patrimonio genetico, da non essere paragonabili a nessun’altra razza. (43) (44)

9.1 Frisona Italiana

La razza Frisona Italiana (*Italian Holstein* in inglese) deriva da incroci ottenuti fra la Frisona Olandese e quella Americana; acquisisce una sua fisionomia e viene riconosciuta come razza a sé stante a partire dagli anni '50 del secolo scorso. I bovini di razza Frisona Italiana hanno mantello pezzato nero o pezzato rosso, statura alta e conformazione armonica, dal profilo dolicomorfo; tutte caratteristiche tipiche di bovine a spiccata attitudine lattifera [Figura 3]. (36)

Data l'elevata produttività, in termini di Kg di latte per lattazione, iniziano via via a sostituire le razze autoctone già dai primi del Novecento e ad oggi si contano più di 1 milione di bovini di questa razza, su tutto il territorio nazionale. (36)

Le caratteristiche quali-quantitative medie della produzione di latte da parte di queste bovine sono di 10.097Kg di latte per lattazione, con un tenore di grasso pari al 3,81% e un 3,36% per le proteine. (45) Dati i valori produttivi, nel nord Italia questa razza da latte è sicuramente la più allevata. (36) Il latte di queste bovine ha però un indice di caseina medio del 76,9%, il più basso fra le razze italiane, con un 11,3% di k-caseina nello specifico ed un contenuto in fosfato colloidale inorganico di calcio pari a 78,5 mg ogni 100 g di latte. (44) Questi valori sono da tenere in considerazione se si parla di resa in formaggio, in quanto hanno un'influenza notevole sulla composizione, le proprietà e la struttura del sistema micellare in fase di caseificazione. (44)

Per quanto attiene alla produzione di carne la razza Frisona è poco indicata. (36) Di fatto il Dottor. Paolo Gambetti, medico veterinario buiatra che opera all'interno del consorzio del Parmigiano-Reggiano da anni, riferisce che i vitelli di suddetta razza nascono con un peso medio compreso fra i 40-50 Kg e vengano venduti a 1,6-2,0 €/Kg.



Figura 3 Bovina di razza *Frisone Italiana* del tipico colore pezzato nero del mantello. (Foto personale, scattata presso l'azienda agricola "Ferretti Tullio, Stefano e Daniele").

9.2 Reggiana

È una razza bovina autoctona dell'Italia settentrionale, in particolare delle province di Reggio Emilia e Parma, che esisterebbe dall'alto Medioevo. Si sarebbe originata dall'incrocio di bovini a mantello fulvo, presenti già in epoca romana, con bovini fromentini provenienti dall'attuale Ungheria. Tutt'oggi è caratterizzata dal mantello rosso fromentino, tendenzialmente più attenuato in corrispondenza delle parti interne degli arti, nel contorno degli occhi e attorno al musello. Sono animali armonici e di taglia media, con mammella ben sviluppata ma non voluminosa [Figura 4]. (36) (46)

A causa della diffusione delle più produttive razze cosmopolite a spiccata attitudine lattifera, quali la Frisona, subì un rapido declino fra il 1960 e il 1970, decennio nel quale fu considerata virtualmente estinta dato il ridotto numero di capi ancora allevato. Nel 1985 ne restavano meno di 1.000 capi (46) e da allora rientra nel "Registro Anagrafico delle popolazioni bovine e gruppi etnici a limitata diffusione", istituito per salvaguardare la genetica delle razze bovine a rischio estinzione. Le politiche di salvaguardia hanno portato così ad un recupero demografico e ad oggi si contano 2.565 capi, ripartiti in 177 allevamenti. (36) (46)

Attualmente è considerata una razza a duplice attitudine ma con prevalenza per la produzione di latte; il quale presenta una composizione che lo rendono ottimale per la trasformazione casearia, nello specifico in Parmigiano-Reggiano. (36) Parlando di caratteristiche quali-quantitative, mediamente le bovine di questa razza producono 5.650 Kg di latte per lattazione, con un 3,54% di grasso ed un 3,45% di proteina (36) Punto di forza di questa razza sono proprio le proteine, nello specifico l'alto indice di caseina, che si aggira attorno al 78%, e il contenuto in k-caseina, pari ad un 12,24%. (44) Presenta inoltre, nel proprio patrimonio genetico, una maggior frequenza della variante B della k-caseina (circa il 50%), variante che è ritenuta più favorevole nella trasformazione casearia del latte. (44) Anche i valori di fosfato colloidale inorganico superano quelli della Frisona Italiana, e sono pari ad 84 mg ogni 100 g di latte. (44) Tutti questi aspetti sono dei punti di forza nell'ottica della trasformazione casearia del latte e lo rendono nettamente superiore rispetto a quello delle frisone per la produzione di Parmigiano-Reggiano. (36) (44)

La Reggiana fa inoltre parte di un progetto “*Dual Breeding*”, per le razze bovine a duplice attitudine, ritenute un modello alternativo di zootecnica sostenibile. Infatti, nonostante presenti una morfologia più da bovina da latte che non da carne, le rese al macello rispetto alla Frisona Italiana sono da ritenersi maggiori. (46) I vitelli alla nascita pesano mediamente come quelli frisoni ma rispetto a questi ultimi verrebbero venduti, alle aziende da ingrasso, a 2,6-3,0 €/Kg (valore dei vitelli fornito dal Dottor. P. Gambetti).



Figura 4 Bovina di razza Reggiana, si notino il mantello fromentino e la morfologia tipica della razza. (Foto s personale, scattata presso l'azienda agricola “Il Cantone”).

9.3 Bianca Modenese

Per quanto riguarda la razza Bianca Modenese sembra che essa abbia avuto origine dall'incrocio degli antichi bovini fromentini italici con quelli grigi di tipo Podolico. È anch'essa una razza autoctona dell'Emilia-Romagna e prende per l'appunto il nome dalla provincia della quale è originaria. L'aggettivo che accompagna il nome della razza descrive bene il mantello della razza, il quale è bianco latteo, con gradazioni di grigio alle spalle ed alle cosce. A volte il ciuffo frontale presenta alcune sfumature rossastre, a ricordare le sue origini dai bovini fromentini. Aspetto che la contraddistingue dalle altre razze bianche italiane è la "spaccatura", una zona rosea a V rovesciata al centro del musello color ardesia. Nel complessivo sono bovini armonici di taglia media e dal buon peso, aspetto che sottolinea la loro duplice attitudine latte-carne [Figura 5]. (36) (47)

Come per la razza Reggiana, anche la Bianca Modenese ha condiviso un destino simile nel secolo scorso, venendo via via sostituita dalle razze cosmopolite più selezionate. Visto il progressivo declino, nel 1985 è entrata a far parte del "Registro Anagrafico delle popolazioni bovine autoctone e gruppi etnici a limitata diffusione"; tuttavia il declino della razza non si è ancora arrestato e ad oggi il Libro Genealogico Nazionale della Bianca Modenese conta non più di 600 capi. (36)

È una razza dal temperamento docile ed estremamente rustica (ottima utilizzatrice di foraggi scadenti), elementi che la rendono idonea anche all'allevamento allo stato brado o semi-brado su terreni difficili, come quelli montani. (47)

Rispetto alle razze cosmopolite, la Bianca Modenese è anche più longeva e le bovine spesso portano a termine 6-10 parti durante la loro carriera produttiva, contro i 4-5 medi della Frisona Italiana. (47) Il sito del consorzio riporta che nel 2004 le 135 bovine iscritte al Libro Genealogico e controllate in provincia di Modena abbiano prodotto, mediamente, 5.165 Kg di latte in 288 giorni di lattazione, con il 3,26% di grasso e 3,47% di proteine. (47) La Bianca Modenese presenta caratteristiche per la caseina del tutto peculiari rispetto alle altre razze allevate nel comprensorio del Parmigiano-Reggiano, ha un indice di caseina che è il più alto in assoluto, ben 79%. I 3 punti in più rispetto alla Frisona (equivalenti a 300 g di caseina in più per quintale) fanno sì che la resa casearia sia notevolmente superiore rispetto a quest'ultima.

(44) Presenta percentuali di k-caseina paragonabili a quelli della Reggiana ed un'uguale distribuzione della variante genetica B. Il latte di queste due razze autoctone ha, inoltre, un 7% in più di calcio rispetto a quello di Frisona. (47)

Fattore da non sottovalutare per la rivalorizzazione di questa razza è l'attitudine da carne, più marcata rispetto a Frisona e Reggiana; anche se, non è paragonabile a quella di razze puramente "da carne". I vitelloni hanno rese al macello del 58-60%; considerando il fatto che non si tratta di una razza da carne, ma duplice attitudine, è una resa di tutto rispetto. (47) A sottolineare l'interesse economico per la produzione di carne da parte di questi bovini, il Dottor. Gambetti ci riporta che, in un allevamento che segue, i vitelli di Bianca Modenese vengono venduto, in genere, a 5,5 €/Kg, quasi 3 volte il valore di un vitello Frisone. Data la conformazione più muscolosa, le bovine a fine carriera danno rese al macello superiori del 5% rispetto a quelle di razze "da latte". (47) Inoltre, le carni presentano una buona marezzatura e non si formano grossi depositi di grasso, rendendole saporite e tenere. (47)



Figura 5 Bovine di razza Bianca Modenese; si notino la "spaccatura" al centro del musello color ardesia ed il ciuffo di peli rossicci sul sincipite. Come si può bene vedere la morfologia di queste bovine richiama molto quella dei bovini da carne. (Foto personale, scattata presso l'azienda agricola "Manicardi Gianni".)

9.4 Piemontese

La Piemontese è una razza originaria del Piemonte che si è costituita dall'incrocio delle razze autoctone con lo zebù pakistano (*Bos taurus indicus*). Proprio di quest'ultimo i bovini maschi mantengono tutt'oggi l'evidente gibbosità sul collo (che viene identificata con il termine "coppo"). I vitelli nascono di colore fromentino carico; i maschi virano poi verso il grigio in età adulta, con macchie scure e peli neri accentuati sulla testa. Le femmine tendono invece al bianco o rimangono fromentino chiare. In questa razza è tipico il ciuffo di peli fromentini che permane in età adulta sul sincipite, così come le mucose e la pelle color ardesia e i peli neri del contorno degli occhi e delle orecchie [Figura 6]. (48) (36)

Con una consistenza di circa 282.000 capi sul territorio nazionale (dati 2019 riportati dal sito ufficiale ANABORAPI (48)) la Piemontese è la razza bovina da carne maggiormente allevata nella nostra penisola. (48) (36)

Nel 1960 è stata costituita l'Associazione Nazionale Allevatori dei Bovini di Razza Piemontese (A.N.A.Bo.Ra.Pi.), con lo scopo di selezionare e migliorare geneticamente la razza. In passato era una razza da cui si ricavava anche latte per la produzione casearia ma ad oggi si è perso questo interesse e viene selezionata per la sola produzione "da carne". (36) Altro elemento che viene tenuto in considerazione per la selezione genetica di questa razza è la "facilità al parto". Lo sviluppo di vitelli eccessivamente muscolosi, associato a problematiche legate al canale del parto stretto nelle bovine, rendono necessari infatti interventi di assistenza al parto importanti da parte del veterinario. (36)

Come detto è una razza con spiccata attitudine da carne, con buoni incrementi ponderali giornalieri in peso vivo e carni di eccellente qualità. I vitelli nascono con un peso che si aggira fra i 40-42 Kg ed hanno un buon incremento ponderale (raggiungono pesi di 550-560 Kg all'età di 14 - 16 mesi), restituendo rese al macello fra le maggiori al mondo (68% del peso vivo). (48)

Un carattere distintivo proprio di questa razza, rispetto alle altre da carne italiane, è il carattere "doppia groppa". Verso la fine del 1800 iniziarono a comparire tori caratterizzati da un'evidente ipertrofia delle masse muscolari del posteriore e che

davano quasi l'impressione che l'animale avesse due groppe, da qui il nome. In realtà questa ipertrofia muscolare incontrollata, e che è accompagnata da una mancata deposizione di grasso, è dovuta ad una forma di omozigosi del gene della miostatina. (49)

Sono bovini che si adattano anche a condizioni di allevamento meno favorevoli e utilizzano bene i pascoli più "poveri", come quelli di montagna; tant'è che in certe aree del Piemonte vengono ancora allevati in alpeggio. La produzione di latte da parte delle bovine è considerata buona e soddisfa le esigenze del vitello sino allo svezzamento. (49) (36)



Figura 6 Bovina di razza Piemontese al pascolo che allatta direttamente il vitello. Si notino la colorazione del mantello della bovina e del piccolo, nonché l'evidente muscolosità che inizia già a caratterizzare quest'ultimo. (Foto presa dal sito dell'ANABORAPI (48)).

9.5 Correlazioni genetiche fra le razze e consanguineità

Studiare il DNA delle diverse razze bovine è molto importante, non solo per ricercare uguaglianze fra i diversi tratti di genoma, attribuibili ad antenati comuni, ma anche per capire come determinati geni si siano selezionati e abbiano permesso ai bovini di adattarsi ai vari habitat. (43)

S. Mastrangelo et al., nel loro studio di genetica condotto sui bovini italiani, hanno osservato come le razze del nord Italia (fra cui Piemontese, Reggiana e Bianca Modenese) siano molto più vicine alle continentali europee che non a quelle del centro-sud Italia. In particolare, si sarebbe osservata una netta distinzione con le razze di derivazione podolica (Romagnola, Marchigiana, Chianina, Maremmana e Podolica). Una notevole distanza genetica vi sarebbe anche fra razze autoctone e Frisona Italiana. Gli autori identificano quindi 3 cluster: razze Podoliche, Frisona Italiana (che fa gruppo a sé stante) e razze del nord-Italia (nel quale rientrano: Reggiana, Bianca Modenese e Piemontese) [Grafico 2]. (43)

Purtroppo, la forte riduzione nel numero di capi delle razze autoctone “da latte”, causata dalla sostituzione con le più produttive cosmopolite, ha fatto sì che la variabilità genetica interna alle singole razze si sia ridotta drasticamente. Questo fenomeno, conosciuto fra i genetisti con il termine “collo di bottiglia”, può essere ben evidenziato dalle analisi sulla consanguineità. Un parametro che viene molto usato è il ROH (*Runs Of Homozygosity*), ovvero i segmenti di DNA che presentano in modo ininterrotto geni omozigoti. Da questo si ottiene l'*inbreeding coefficient* (coefficiente di consanguineità) che più è elevato minore sarà la numerosità effettiva della popolazione. (43) Non è però solamente la riduzione di numerosità di una popolazione che può portare ad un pericoloso aumento della consanguineità. Anche i programmi troppo spinti di selezione genetica e genomica, che favoriscono la riproduzione di una ristretta cerchia di tori “miglioratori”, porta ad una pericolosa diminuzione della variabilità genetica interna alla razza. (50)

Considerando le razze oggetto della presente ricerca, riportiamo i dati di S. Mastrangelo et al. sulla consanguineità. La Frisona Italiana avrebbe un coefficiente di consanguineità all'incirca del 6,4%, la Reggiana del 5,9%, la Bianca Modenese del 7,3% mentre la Piemontese del 2,7%. (43)

Salvaguardare le razze autoctone è fondamentale per non perdere le loro caratteristiche peculiari e che hanno fatto sì che si adattassero al territorio di appartenenza e a determinati prodotti locali. Il genoma di queste razze è inoltre fonte di variabilità genetica all'interno della specie bovina. (43)

I programmi di tutela di queste popolazioni bovine si occupano dei piani di riproduzione così da far accoppiare fra loro gli individui appartenenti alla stessa razza, al fine di non perdere le loro peculiarità genetiche. Allo stesso tempo dovrebbero controllare, però, che non si venga a creare un'eccessiva consanguineità nella popolazione. (43)

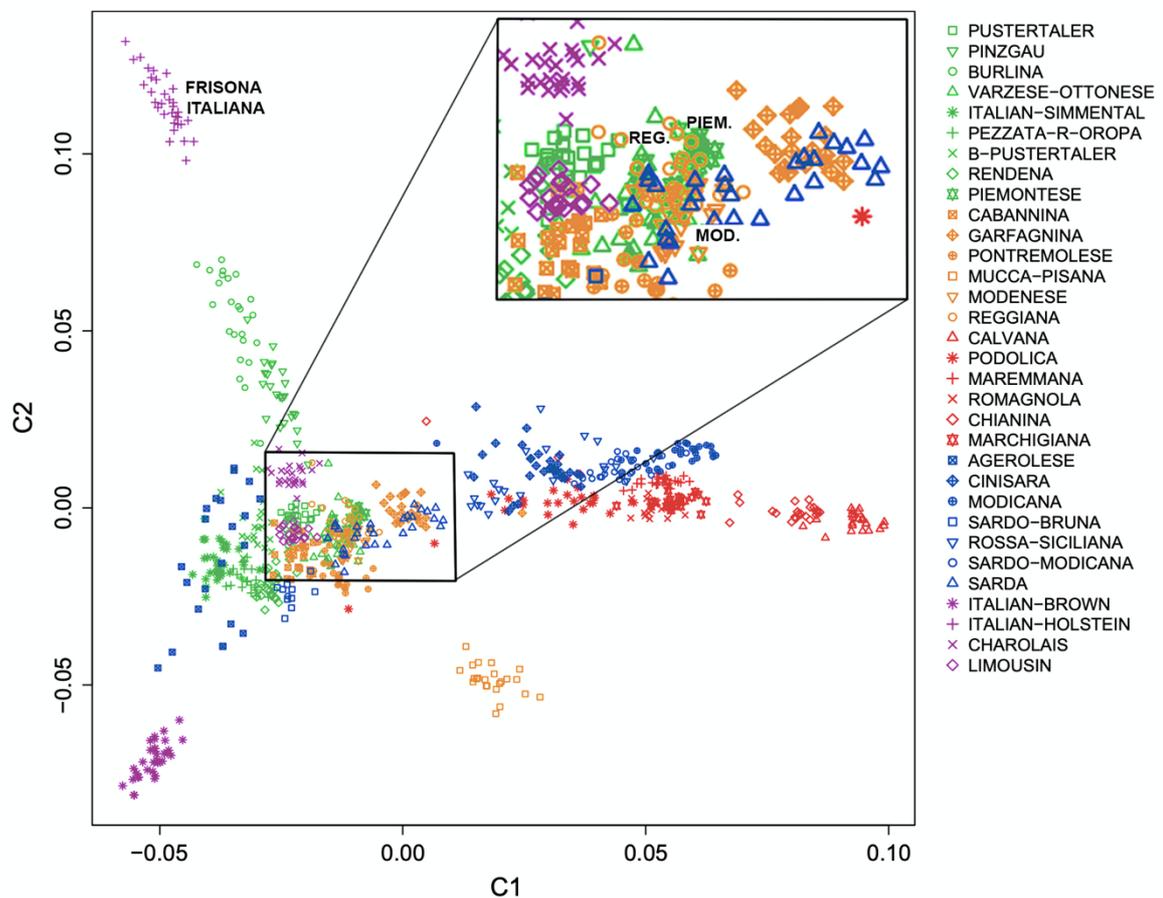


Grafico 2 Mappa genetica delle razze bovine italiane, gentilmente concessa da Salvatore Mastrangelo (43). Abbiamo contrassegnato e fatto uno specchietto all'interno del grafico per mettere in risalto la distanza genetica delle razze oggetto del nostro studio: Frisone Italiana, Reggiana, Bianca Modenese e Piemontese. Si veda la legenda accanto per identificare meglio le singole razze.

10 Scopo della tesi

La presente tesi di laurea è frutto di uno studio di campo condotto sul trasferimento di immunità passiva colostrale dalle vacche ai vitelli. Lo scopo era di valutare se vi fossero differenze di razza nell'immunizzazione dei vitelli, dettate dall'attitudine produttiva delle bovine. Gli studi condotti in tal senso sono sempre stati pochi e si sono incentrati per lo più sulla composizione del colostro. Inoltre, non hanno mai fatto risaltare pienamente quanto la selezione genetica possa aver inciso sull'immunizzazione dei vitelli. Riteniamo infatti che vi sia un'importante correlazione fra livelli produttivi delle bovine da latte e colostro, sia in termini qualitativi che quantitativi.

Pensiamo che, aver analizzato come l'attitudine produttiva, frutto di avanzati programmi di selezione genetica, abbia inciso sull'immunizzazione dei vitelli possa essere di rilevante interesse nel campo bovino. Utile, *in primis*, per cercare di affrontare le sfide moderne che i veterinari e gli allevatori si trovano a dover affrontare sull'uso degli antibiotici in azienda. Si vuole, infatti, richiamare l'attenzione delle associazioni di razza su questi aspetti, perché non si soffermino, solamente, sugli indici produttivi nella formulazione dei programmi di selezione.

Obiettivo della presente tesi di laurea è anche quello di cercare ulteriori punti di forza a favore delle razze autoctone da latte, al fine di stimolare l'interesse per la salvaguardia del loro patrimonio genetico.

MATERIALI e METODI

Le analisi sono state condotte su campioni di siero ematico prelevati dai vitelli di quattro razze, che differiscono per attitudine, livelli produttivi (produzione latte) e rusticità.

- ✓ **Frisona Italiana:** grazie alla sua spiccata attitudine lattifera e alla selezione genetica di cui è stata oggetto per migliorarne le produzioni si è ampiamente diffusa sul territorio nazionale sostituendo le razze autoctone meno produttive. (36) È stata oggetto di numerosi studi che hanno messo in luce come questa forte spinta verso la produzione di latte abbia penalizzato la rusticità della razza e la qualità del colostro. (10) (37)
- ✓ **Reggiana:** autoctona dell'areale di produzione del Parmigiano-Reggiano; è una razza a duplice attitudine ma che è più vocata alla produzione da latte. Anche se meno produttiva della Frisona, le caratteristiche qualitative che si attribuiscono al latte di queste bovine sono ottimali per la sua trasformazione casearia. (36) (46)
- ✓ **Bianca Modenese:** altra razza autoctona, vocata alla produzione di Parmigiano-Reggiano e particolarmente rustica. Viene anch'essa considerata a duplice attitudine ma in modo più bilanciato per la produzione da carne rispetto alla Reggiana. In confronto a quest'ultima, parlando delle caratteristiche lattifere, è meno produttiva ma presenta molte similitudini qualitative. (36) (47) (44)
- ✓ **Piemontese:** razza autoctona "da carne" che è stata oggetto di un'importante selezione genetica per tale attitudine. La produzione latte da parte delle bovine non è più, ad oggi, di interesse ai fini commerciali ed è ritenuta proporzionata alle necessità del vitello lattante. (48) (36)

Il grado di trasferimento di immunità passiva colostrale è stato valutato analizzando i campioni di siero ematico mediante test di precipitazione delle IgG sieriche con soluzione 1,3 molare di sodio solfito. (5)

I risultati ottenuti sono stati inseriti in un programma informatico (Microsoft Excel), grazie al quale è stato possibile confrontare i risultati delle diverse razze. In ultimo, abbiamo calcolato, mediante Test t di Student, se le differenze anticorpali fra le razze fossero statisticamente significative. Abbiamo preso in considerazione un livello di significatività del 5% ($\alpha = 0,05$), ritenendo quindi significative solamente differenze che risultassero inferiori a tale soglia per i valori di probabilità ($p < 0,05$).

Sono stati analizzati anche alcuni campioni di colostro delle razze Frisona, Reggiana e Bianca Modenese, mediante metodica rifrattometrica, direttamente in campo. Visto il tipo di allevamento della razza Piemontese (linea vacca-vitello con allattamento diretto da parte della madre) non abbiamo avuto modo di raccogliere campioni di colostro da suddetta razza.

11 Allevamenti oggetto dello studio

Nel nostro studio sono stati coinvolti 14 allevamenti. Di questi, 10 sono situati nel comprensorio del Parmigiano-Reggiano (9 in provincia di Reggio-Emilia ed 1 in provincia di Mantova) e grazie ad essi abbiamo reperito i vitelli delle razze: Frisona, Reggiana e Bianca Modenese. A questi allevamenti si aggiungono i 4 situati in Piemonte e che abbiamo coinvolto per reperire i campioni ematici dei vitelli di razza Piemontese.

Più nello specifico annotiamo quanto segue:

- In quattro aziende si allevano esclusivamente bovine di razza Frisona Italiana a stabulazione libera. Possiamo considerarli di medie dimensioni, con una consistenza di capi in lattazione di 100-110 animali. La produzione media di questi allevamenti si attesta sui 9.300 Kg di latte/lattazione/capo; in linea, quindi, con i dati ANAFI (45).
- Una azienda è prettamente di bovine di razza Reggiana, ma sono presenti anche 4 bovine di razza Bianca Modenese. È un allevamento a stabulazione libera che munge all'incirca 110 capi. Secondo i dati dell'associazione della razza Reggiana è al quinto posto per numero di capi allevati (212 bovine) fra tutti gli allevamenti registrati per tale razza (46). La produzione media si attesta sui 5.000 Kg/capo/lattazione, in linea con quanto viene riportato in letteratura (36).
- Due aziende sono vecchie realtà a posta fissa, di piccole dimensioni, in cui vengono allevate quasi esclusivamente bovine di razza Bianca Modenese. L'allevamento con la consistenza maggiore di capi (36 bovine di razza Bianca Modenese) è l'unico allevamento in provincia di Reggio Emilia ad allevare un numero consistente di bovine di tale razza. Il secondo allevamento, ora chiuso, si trovava in provincia di Mantova e allevava 10 capi di tale razza. (Ricordiamo che il numero di capi di Bianca Modenese registrati nei libri genealogici di razza è molto limitata, se ne contano appena 600 secondo i dati riportati in letteratura (36)). La produzione media di queste aziende è di 3.600 Kg di latte/capo/lattazione.

- Due allevamenti hanno fornito parte dei campioni di siero per i vitelli di razza Reggiana. In questi non vengono allevate esclusivamente bovine di tale razza ma se ne contano 15 di razza Reggiana, nate da embrioni impiantati alcuni anni fa.
- In ultimo, i quattro allevamenti di bovini di razza Piemontese sono a stabulazione libera e allevano i vitelli attuando la “linea vacca-vitello”; i piccoli vengono cresciuti dalla madre fino allo svezzamento ed essa li allatta direttamente. Per tanto, non è stato possibile quantificare la produzione di colostro da parte di tali bovine e verificarne la qualità. Dato l’elevato *turn-over* di animali, non possiamo dare una stima accurata del numero dei capi che vengono allevati.

Nella maggior parte degli allevamenti ad indirizzo per la produzione di latte i vitelli sono stabulati singolarmente in gabbiette rialzate per una settimana, dopo di che passano in box collettivi a lettiera permanente [Figura 8] e [Figura 9].

L’allevamento di maggiori dimensioni di razza Reggiana stabula i vitelli negli igloo fino a 3 settimane [Figura 10], dopo di che passano nei box collettivi a lettiera permanente.

I due allevamenti a posta fissa di razza Bianca Modenese, invece, stabulano direttamente gli animali neonati in gruppi su lettiera permanente, in locali interni [Figura 11].

Ai fini del presente studio era molto importante che le influenze negative dovute alle mal pratiche di colostratura dei vitelli non alterassero i dati; per tanto, ci siamo premurati di monitorare l’attività di somministrazione del colostro ai vitelli. Quando notavamo che le buone norme di colostratura non venivano seguite consigliavamo agli allevatori come procedere; di modo tale che fossimo certi che i vitelli assumessero il colostro nel modo più idoneo. La *compliance* degli allevatori è stata quindi fondamentale e capo saldo ai fini di una corretta esecuzione dello studio.



Figura 7 Vitelli di razza Frisona, di una settimana di vita, a stabulazione singola nelle gabbiette rialzate. (Foto scattata personalmente nell'azienda agricola "La Piccola".)

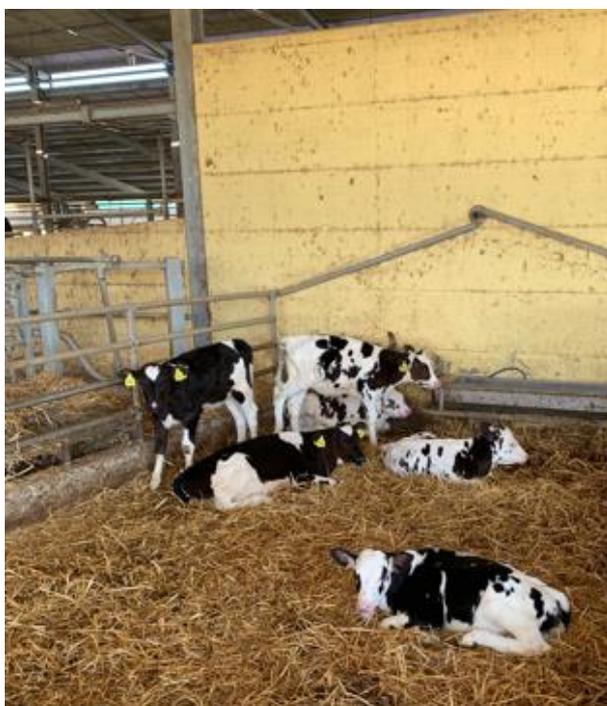


Figura 8 Vitelli di razza Frisona di più di 2 settimane di età stabulati su lettiera permanente. (Foto personale scattata nell'azienda agricola "Ferretti Tullio, Stefano e Daniele".)



Figura 9 Vitello di razza Reggiana all'interno di un igloo. (Foto personale scattata presso l'azienda agricola "Il Cantone").



Figura 10 Vitella di razza Bianca Modenese su lettiera permanente. Il soggetto nella foto ha un mantello color fromentino chiaro. Di fatto, i vitelli di questa razza possono presentare fin dalla nascita la colorazione tipica bianco-lattea, oppure essere di color fromentino e virare al bianco crescendo. Ancora una volta ritroviamo nella razza Bianca Modenese elementi che richiamano le sue origini dai bovini fulvi. (Foto personale scattata presso l'azienda agricola "Manicardi Gianni").

12 Raccolta e gestione del materiale biologico

In ogni azienda sono stati effettuati prelievi di sangue venoso dai vitelli di età compresa fra i 3-10 giorni di vita; per un totale di 127 campioni (41 da vitelli di razza Frisona Italiana, 32 di Reggiana, 29 di Bianca Modenese e 25 di Piemontese).

Ai fini del presente studio, e della metodica impiegata per le analisi, abbiamo stabilito che l'intervallo di età 3-10 giorni di vita fosse l'ideale per il prelievo ematico. Infatti, in tale periodo, gli animali hanno sicuramente cessato l'assorbimento di immunoglobuline a livello intestinale, i titoli anticorpali si sono stabilizzati e non sono influenzati in modo significativo dalla produzione endogena di IgG, che è ancora limitata. (1) (5)

Quando gli allevatori ci segnalavano la nascita di un vitello provvedevamo ad annotarlo in agenda. Calcolando poi che l'animale rientrasse nel *range* di età stabilito, ci recavamo negli allevamenti dopo minimo 3, massimo 10 giorni dalla nascita ad effettuare il prelievo di sangue.

Tutti i prelievi ematici sono stati fatti dalla vena giugulare, utilizzando la seguente strumentazione: ago multiplo, camicia porta-provette a campana e provetta sottovuoto da siero (provetta con tappo rosso contenente CAT: *Serum Clot Activator*). [Figura 12]



Figura 11 Strumentazione per effettuare i prelievi ematici. Da sinistra abbiamo: ago multiplo, camicia porta provetta e provetta dal tappo rosso. (Foto personale del materiale impiegato nello studio).

La procedura adottata per la raccolta e la gestione dei campioni è stata la seguente:

1° Prima di procedere con il prelievo controllavamo che i vitelli non presentassero evidenti segni di patologie in atto; animali collassati, disvitali, abbattuti o con evidente imbrattamento fecale del posteriore non sono stati inclusi nello studio. Verificare che gli animali non avessero segni di malattia clinicamente manifesta è servito per evitare, almeno in parte, di includere soggetti malati nello studio, il che avrebbe portato, inevitabilmente, ad una errata valutazione dei titoli anticorpali trasferiti mediante il colostro materno. (10)

2° Un operatore effettuava il prelievo dalla vena giugulare, aiutato da un secondo che immobilizzava l'animale e ne teneva la testa estesa, così da facilitare l'esposizione della vena.

3° Una volta prelevato il sangue si contrassegnava la provetta con un numero univoco, progressivo, così da poter risalire all'animale da cui era stato prelevato (razza, età al momento del prelievo e azienda di provenienza). Nel presente studio non abbiamo ritenuto necessario discriminare fra vitelli maschi e femmine, in quanto sapevamo che gli allevatori coinvolti nella ricerca ponevano la stessa attenzione nella colostratura di entrambi i sessi.

4° Il prelievo veniva quindi lasciato riposare a temperatura ambiente (all'incirca 20°C) così da farlo coagulare adeguatamente. Ovvero, quando si aveva un coagulo ben formato, consistente ed il siero era ben separato dalle altre componenti ematiche. [Figure 13 e 14]

5° Il campione così sierato veniva poi prontamente centrifugato impostando la centrifuga a 2.500 giri per 5 minuti. Oppure, nel caso non fosse possibile procedere con tale operazione il giorno stesso, veniva refrigerato a +4°C e centrifugato entro massimo 12 ore dal prelievo.

6° Una volta centrifugato procedevamo al travaso del siero in una micro-provetta da laboratorio, sulla quale riportavamo il numero identificativo del campione.

Volendo il siero così ottenuto sarebbe già pronto per l'analisi ma abbiamo preferito congelare prima tutti i campioni e scongelarli in un secondo momento così da analizzarli in blocchi di uguale numerosità. Per conservare adeguatamente i campioni, ed evitare che la componente anticorpale si deteriorasse, sono stati congelati in un apposito freezer da laboratorio a -20°C.

I prelievi di sangue dei vitelli delle razze sono stati svolti in un arco di tempo di circa un anno e mezzo, da novembre 2019 a giugno 2021.

Non abbiamo avuto modo di raccogliere in modo appaiato siero ematico dei vitelli e colostro della madre. Tuttavia, abbiamo provveduto alla raccolta anche di alcuni campioni *random* di colostro, alla prima munta dopo il parto, dalle razze Frisona, Reggiana e Bianca Modenese. A tal fine abbiamo utilizzato siringhe e contenitori sterili, per mezzo dei quali prelevavamo il colostro, appena munto, dal secchio. Come detto in precedenza non è stato possibile analizzare campioni di colostro dalle bovine di razza Piemontese.



Figura 12 *Prelievo di sangue fresco; come si può vedere il sangue appare omogeneo. (Foto personale).*



Figura 13 *Aspetto di un campione ematico correttamente coagulato. Si noti la presenza del coagulo sul fondo della provetta ed il siero, limpido, nella parte alta. (Foto personale).*

13 Analisi di laboratorio del siero mediante test di precipitazione in sodio solfito

Una volta raccolta e congelato la totalità dei campioni, che ci eravamo posti come obiettivo per lo studio, abbiamo iniziato ad analizzarli in laboratorio, suddividendoli in gruppi di una ventina per volta.

Come tecnica di analisi in laboratorio abbiamo adottato il test di precipitazione in sodio solfito, che è la metodica semi-quantitativa più accurata nella stima dei titoli anticorpali, nonché quella che combina al meglio precisione, economicità, rapidità e facilità di esecuzione. (40) (5) (9)

13.1 Preparazione della soluzione test di sodio solfito

La metodica che abbiamo deciso di adottare prevede l'impiego di 3 soluzioni di sodio solfito 1,3 molare (5) a diversa concentrazione: 14%, 16% e 18%. (22)

Le soluzioni sono state preparate in laboratorio, sotto cappa a flusso laminare ed impiegando vetreria sterile, così da cercare di evitarne la contaminazione.

Di seguito riportiamo la formula per calcolare quanti grammi di sale di Na_2SO_3 (sodio solfito) sciogliere in acqua deionizzata sterile, sulla base del volume finale che se ne vuole preparare e della concentrazione che deve avere la soluzione (14, 16 o 18%).

$$\text{Grammi di sale} = \frac{\text{Volume della soluzione (mL)} \times \text{Concentrazione desiderata} \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right)}{100}$$

Quando sono iniziate le analisi in laboratorio abbiamo deciso di preparare 600 mL di soluzione per ciascuna concentrazione, così da avere un volume di reagente sufficiente per analizzare tutti i campioni.

Una volta stabilito il volume finale che avrebbero dovuto avere le soluzioni e calcolato quanto sale di sodio solfito sciogliere per preparare ciascuna diluizione, si è proceduto come segue:

1. Si sono pesati, mediante bilancia analitica, i grammi di sale di Na_2SO_3 1,3 molare necessari per preparare 600 mL di ciascuna delle 3 soluzioni (84 g per la diluizione al 14%, 96 g per quella al 16% e 108 g per quella al 18%) e li abbiamo versati in 3 diverse beute graduate. Dal momento che avremmo proceduto con lo scioglimento del sale al loro interno, si sono scelte le beute così che la loro capacità volumetrica fosse adeguata al volume di soluzione da preparare (600 mL nel nostro caso). Una volta travasato il sodio solfito nelle beute ne ricoprivamo l'imboccatura, onde evitare contaminazioni, e le portavamo sotto cappa a flusso laminare per l'esecuzione del passaggio successivo. [Figura 15]
2. Si è proceduto aggiungendo l'acqua deionizzata sterile necessaria a far sciogliere tutto il sale di sodio solfito (all'incirca 3/4 del volume finale della soluzione è un quantitativo di acqua deionizzata adeguato a far sciogliere tutto il sodio solfito delle varie concentrazioni). Per far sciogliere adeguatamente il sale abbiamo impiegato degli agitatori magnetici; a tal fine inserivamo un'ancoretta magnetica in ciascuna beuta.
3. Una volta ricoperto l'imbocco delle beute le toglievamo dall'ambiente sterile della cappa a flusso laminare e le andavamo a posizionare su di un agitatore magnetico. Attendevamo quindi il tempo necessario a far sì che il moto vorticoso delle ancorette sciogliesse, visivamente, tutto il sale di Na_2SO_3 (all'incirca 1 ora).
4. Una volta sciolto tutto il sodio solfito abbiamo riportato sotto cappa le beute e rimosso le ancorette per mezzo di un magnete. A questo punto si sono versate le soluzioni in un cilindro graduato e le si è portate a volume con l'acqua deionizzata sterile necessaria.
5. Al termine, ciascuna soluzione è stata travasata in un contenitore sterile provvisto di tappo e si è provveduto ad etichettarle adeguatamente.

Concluse le fasi di preparazione è già possibile impiegare le soluzioni per il test di precipitazione in sodio solfito, oppure le si può conservare, appositamente chiuse, a temperatura ambiente.

Annotiamo il fatto che la conservabilità media delle 3 soluzioni, nel nostro caso, è stata di 2 mesi; dopo tale lasso di tempo si sono sviluppati dei lievi sedimenti marroni, indice di una contaminazione delle stesse in fase di preparazione o di utilizzo. Per evitare che questa proliferazione, seppur lieve, interferisse con l'interpretazione delle analisi, abbiamo deciso di rifare le soluzioni ogni qual volta ne notassimo un minimo sviluppo. I campioni sono stati analizzati sempre impiegando soluzioni limpide.

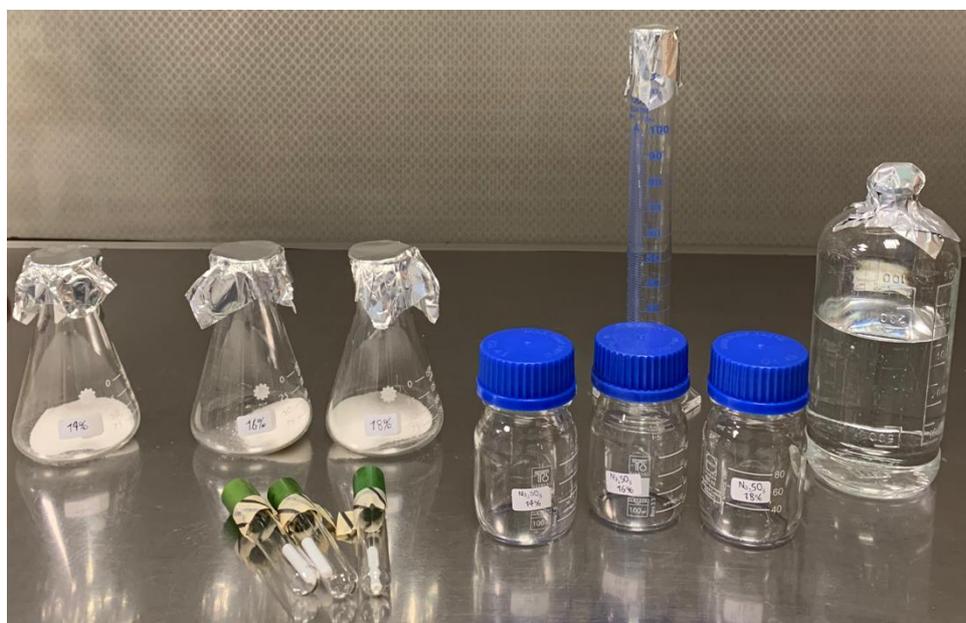


Figura 14 Materiale per l'allestimento delle soluzioni test di sodio solfito. La vetreria impiegata è stata la seguente: 3 beute (quelle in foto contengono già il sale pesato per preparare le 3 soluzioni), un cilindro graduato e 3 recipienti sterili dotati di tappo. Nel recipiente a destra vi è l'acqua deionizzata sterile; le tre provette, nella parte bassa a sinistra, contengono invece 3 ancorette magnetiche sterili. (Foto personale).

13.2 Analisi dei campioni e interpretazione della prova di precipitazione

Il test di precipitazione in sodio solfito è stato descritto in precedenza; di seguito andremo ad illustrare il procedimento seguito in laboratorio.

Dal momento che si devono impiegare tre diverse concentrazioni della soluzione reagente, per ogni campione da testare, al fine di evitare confondimenti durante la prova si è deciso di impiegare provette dotate di tappo colorato, secondo il seguente protocollo:

- Tappo blu: soluzione di Na_2SO_3 al 14%.
- Tappo verde: soluzione di Na_2SO_3 al 16%
- Tappo rosso: soluzione di Na_2SO_3 al 18%.

Il quantitativo totale di provette test da impiegare è quindi pari a tre volte il numero di campioni da analizzare. [Figura 16]

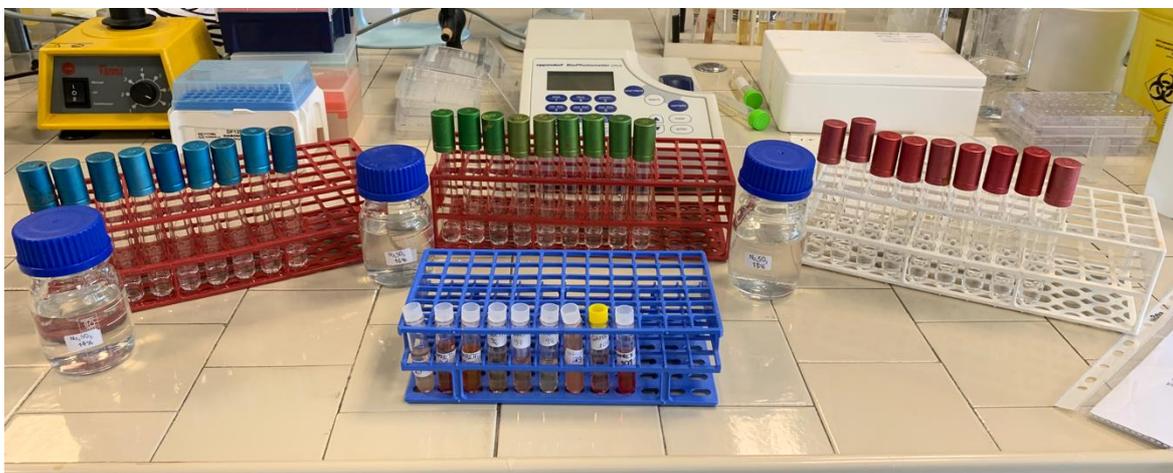


Figura 15 La foto è stata scattata in fase di analisi e permette di apprezzare la disposizione delle provette. Avevamo già ripartito le soluzioni test di sodio solfito nelle provette, così come indicato nel protocollo da noi adottato, ovvero, rispettivamente, la soluzione al 14% in quelle dal tappo blu, la soluzione al 16% in quelle dal tappo verde e, infine, la soluzione al 18% nelle provette dal tappo rosso. Al centro, nel porta provette blu, vi sono i sieri che saremmo andati ad analizzare. (Foto personale).

Per la metodica di analisi in laboratorio ci siamo basati, principalmente, su quanto riportato nell'articolo "*Evaluation of 3 Assays for Failure of Passive Transfer in Calves*" (22); nel quale viene descritto il procedimento di analisi e come interpretare i risultati della prova di precipitazione.

Procedimento:

1. Si estraevano i sieri dal freezer ponendoli, in ordine, in un apposito porta provette, dove venivano lasciati scongelare a temperatura ambiente (all'incirca 20-24°C). Lo stesso veniva fatto per le provette deputate ad ospitare le soluzioni test.
2. Mentre attendavamo che i sieri scongelassero procedevamo con la distribuzione del reagente fra le provette. Mediante pipettatore elettrico e pipette graduate da 2 mL, abbiamo inserito 1,9 mL di soluzione di sodio solfito (22), alle diverse concentrazioni, in ciascuna provetta dal tappo colorato, così come stabilito nel protocollo da noi adottato. Ogni volta che una provetta veniva preparata il tappo veniva riposto sull'imboccatura, così da evitare che si contaminasse. Inoltre, al cambio della concentrazione della soluzione da prelevare, si cambiava pipetta graduata, al fine di evitare contaminazioni crociate fra le soluzioni a diversa concentrazione.
3. Una volta conclusa la distribuzione del reagente fra tutte le provette, e accertatisi che tutti i sieri fossero scongelati (in genere trascorsa 1 ora a 20-24°C erano tutti scongelati a dovere), si poteva proseguire. Per mezzo di un micropipettatore meccanico tarato a 100µL e di un capillare in vetro prelevavamo 0,1 mL di siero (22) e lo inserivamo nella provetta contenente il reagente. Partivamo sempre dalla soluzione a più bassa concentrazione (14%) e terminavamo con quella alla più alta (18%). Questo è servito per evitare che eventuali contaminazioni da parte delle soluzioni più concentrate facessero precipitare le immunoglobuline più facilmente nelle provette contenenti una minor concentrazione di solfito di sodio. Una volta inseriti 0,1 mL del campione in ciascuna delle 3 soluzioni, le provette venivano richiuse con il proprio tappo ed il campione veniva riposto. Prima di passare al siero successivo si asciugava bene, con della carta pulita, il capillare dai residui eventualmente presenti sulla punta.

4. Terminato l'allestimento delle prove agitavamo leggermente le provette così da mescolare bene siero e solfito di sodio. Una volta che le soluzioni sono adeguatamente mescolate, la reazione di precipitazione è praticamente istantanea. Seguendo, però, le indicazioni trovate in letteratura abbiamo deciso di lasciare incubare le soluzioni a 20-24°C per 15 minuti, al fine di permettere alle reazioni di precipitazione di svilupparsi adeguatamente. (22)

5. Una volta trascorsi i 15 minuti di incubazione si procedeva con l'interpretazione del livello di intorbidimento delle soluzioni. Come descritto in letteratura abbiamo deciso di porre un foglio scritto (abbiamo impiegato "*Lorem Ipsum*", un testo scritto in latino senza significato alcuno) dietro alle provette, così da valutare meglio se vi fosse lo sviluppo di un precipitato di grado adeguato nelle soluzioni. La prova è ritenuta positiva, infatti, quando la torbidità è tale da non permettere la lettura del foglio. (22)

Per l'attribuzione degli *score* abbiamo proceduto come segue:

1° Nella prima fase valutavamo, per ogni campione, se vi fosse, o meno, sviluppo di reazione positiva con le diverse concentrazioni di reagente. Si è attribuito un "+" solo alle provette nelle quali la torbidità fosse particolarmente evidente e tale da non permettere la lettura del foglio postovi dietro. Il valore "-" è stato attribuito, invece, nel caso la soluzione in provetta rimanesse trasparente oppure la torbidità si sviluppasse ma fosse troppo lieve e permettesse comunque la lettura del foglio scritto. [Figura 17]. Il tutto veniva registrato, campione per campione, in una tabella a tre colonne.

2° Al termine della valutazione del grado di torbidità procedevamo attribuendo uno *score* numerico complessivo a ciascun siero. Per il calcolo del punteggio finale abbiamo seguito il seguente schema: ogni "+" valeva +1, mentre il "-" valeva 0. (22) Per cui, facendo alcuni esempi, un campione con tutte e 3 le soluzioni "-" riceveva un punteggio finale 0 (punteggio minimo) mentre, un campione con tutti "+" otteneva uno *score* finale pari a 3 (punteggio massimo).

Al fine di un'interpretazione più oggettiva, i risultati dei test di precipitazione sono stati valutati sempre dagli stessi due operatori, che si confrontavano sui valori “+” e “-” da attribuire a ciascuna prova di precipitazione.



Figura 16 Questa foto permette di apprezzare diversi gradi di intorbidimento. A sinistra della linea rossa abbiamo posto provette nelle quali NON vi è una torbidità adeguata per poter attribuire un segno “+” alla reazione di precipitazione, essendo ancora ben leggibile il foglio scritto postovi dietro, queste due provette hanno quindi ricevuto un segno “-”. A destra, invece, è possibile apprezzare due provette nelle quali l'intorbidimento è di grado adeguato a rendere illeggibili le scritte sul foglio; di conseguenza a queste è stato attribuito un segno “+”. (Foto personale).

14 Analisi del colostro mediante rifrattometro

Il colostro di un numero limitato di bovine pluripare di razza Frisona, Reggiana e Bianca Modenese è stato analizzato direttamente in azienda. Sono stati prelevati solamente campioni di colostro provenienti dalla prima mungitura dopo il parto per un totale di 10 campioni: 4 da bovine frisone, 3 da bovine reggiane e 3 da bovine bianche modenesi.

Abbiamo adottato un rifrattometro a compensazione automatica della temperatura poiché in letteratura si riporta che sia più preciso del densimetro nella stima del contenuto anticorpale del colostro. (19) (11) (17)

Prima di analizzare un qualsiasi campione abbiamo controllato la taratura del rifrattometro così come indicato nel libretto di istruzioni dello strumento. (20) Una volta certi che fosse correttamente tarato abbiamo proceduto con l'analisi, così come segue:

1° Il colostro appena munto è stato mescolato all'interno di un secchio così da distribuirne in modo uniforme il contenuto.

2° Per mezzo di una siringa sterile si è prelevato il quantitativo desiderato di colostro [Fig. 18]. Appena 2 mL sono più che sufficienti per la sola analisi rifrattometrica.

3° A questo punto si poneva una goccia di colostro sul prisma dello strumento [Figura 19], si richiudeva la piastra di copertura e si premeva leggermente. (20)

4° Puntando lo strumento verso una zona ben illuminata andavamo ad effettuare la lettura del risultato. Attraverso l'oculare è possibile vedere una scala numerica da 0 a 30 con due bande colorate sul fondo; la lettura viene fatta in corrispondenza del punto di transizione fra parte chiara e blu. (20)

5° Una volta certi della lettura lavavamo accuratamente il prisma dello strumento con acqua distillata e lo asciugavamo a dovere con un panno pulito.

Per ciascuna razza abbiamo annotato i valori restituiti dalla lettura rifrattometrica e ne abbiamo ricavata la media matematica.



Figura 17 Fase di prelievo di un campione di colostro: l'operatore sta aspirando con una siringa sterile un piccolo quantitativo di colostro appena munto per analizzarlo. Quello nella foto è colostro munto da una bovina Reggiana, ed è stato prelevato presso l'azienda agricola "Il Cantone". (Foto personale).



Figura 18 Esecuzione dell'analisi mediante rifrattometro: l'operatore ha appena posto una goccia di colostro sul prisma dello strumento. (Foto personale).

RISULTATI

15 Risultati del test di precipitazione in sodio solfito sui sieri dei vitelli

Come anticipato nei capitoli precedenti, il test di precipitazione in sodio solfito prevede l'impiego di 3 provette con 3 diverse diluizioni. Quando in provetta si sviluppava un precipitato di intensità tale da non permettere la lettura del foglio postovi dietro attribuivamo un "+". Veniva assegnato un "-", invece, in caso di assenza di precipitato evidente. A ciascuna campione è stato poi attribuito un punteggio, da 0 a 3, in base al numero di provette nelle quali la reazione di precipitazione fosse ritenuta positiva "+". [Figura 20]

Il *cut-off* è stato stabilito ad uno *score* pari ad 1, ovvero sviluppo di torbidità con la sola soluzione al 18%, così come viene indicato in letteratura. (19) (22) Tutti i sieri con punteggio <1 sono stati catalogati come FPT, mentre abbiamo considerato aventi titoli anticorpali protettivi i sieri con punteggio ≥ 1 . In più articoli si riporta che anche in presenza di titoli anticorpali parzialmente protettivi si sviluppi torbidità con la soluzione di Na₂SO₃ al 18%. Tuttavia, mediamente i sieri catalogati con lo *score* 1 avrebbero una concentrazione anticorpale sierica di 1.250 mg/dL di IgG1 (22), che è superiore alla soglia minima dei 1.000 mg/dL (5). (22) (19) (9) (5)

Di seguito viene riassunto come sono stati interpretati i dati, così da semplificare quanto espresso nelle righe precedenti:

- *Score* 0: FPT, titolo anticorpale inferiore alla soglia minima ritenuta protettiva.
- *Score* 1: *cut-off*, titolo anticorpale considerato di livello minimo protettivo.
- *Score* 2: titolo anticorpale buono, sicuramente protettivo.
- *Score* 3: titolo anticorpale eccellente, sicuramente protettivo.

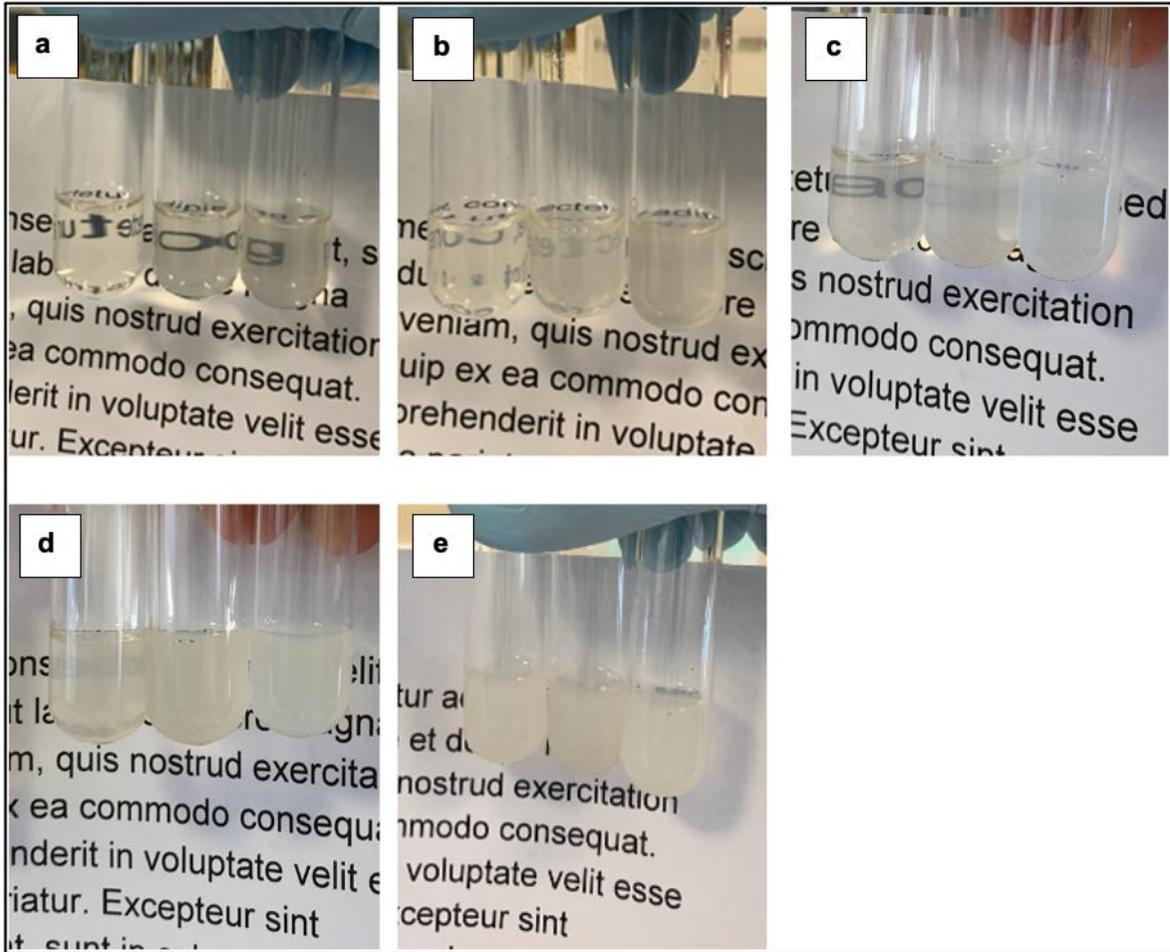


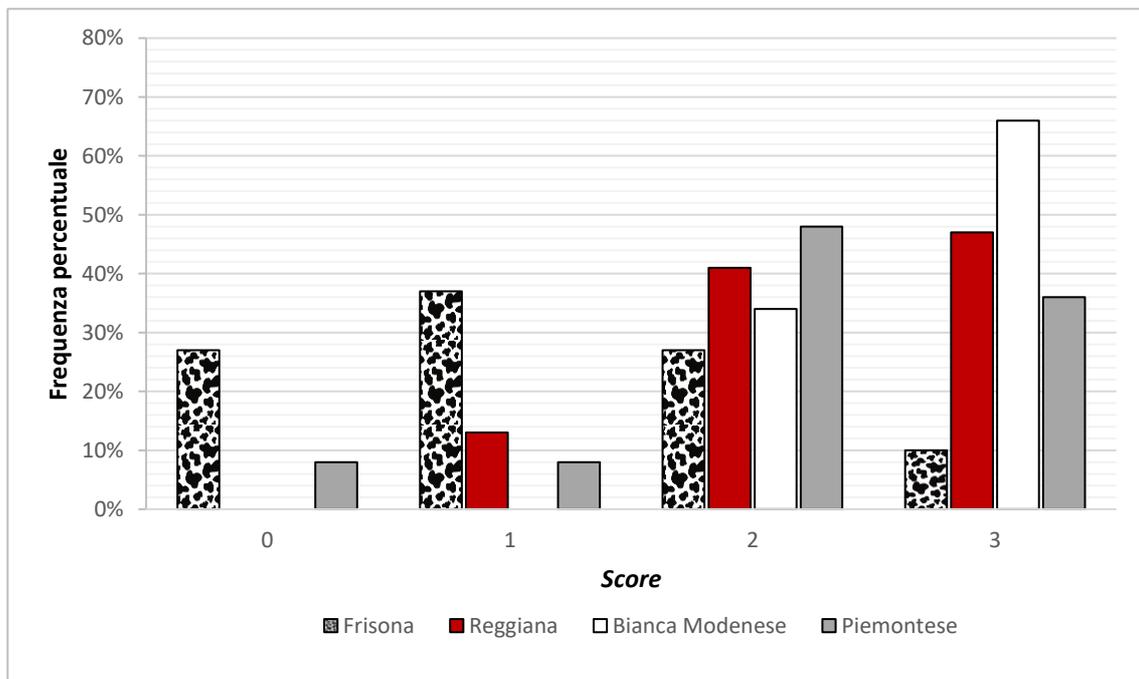
Figura 19 Serie di foto scattate in laboratorio in cui è possibile apprezzare la torbidità generata dalla reazione di precipitazione delle immunoglobuline sieriche a contatto con le 3 soluzioni test di sodio solfito. Abbiamo 5 diversi campioni; rispettivamente gli score attribuiti sono stati i seguenti: **a** score 0, **b** score 1, **c** score 2, **d** ed **e** score 3. (Foto personali).

Nella Tabelle 5 e nel Grafico 3 riportiamo i risultati del test di precipitazione in sodio solfito, effettuato sui 127 campioni complessivi di siero ematico dei vitelli delle 4 razze bovine oggetto dello studio: Frisona Italiana, Reggiana, Bianca Modenese e Piemontese. Nello specifico, in Tabella 5 riportiamo: numero di vitelli analizzati, numero di campioni che hanno fatto registrare ciascuno score e percentuale di vitelli in FPT. Il Grafico 3 è un confronto fra le 4 razze dal punto di vista delle distribuzioni delle frequenze percentuali per i vari score.

Tabella 5 Resoconto complessivo dei risultati ottenuti dalle analisi dei sieri mediante test di precipitazione in sodio solfito. Viene riportato il numero di campioni che ha fatto registrare ciascuno score e l'incidenza percentuale di soggetti in FPT per ciascuna popolazione.

RAZZA	Numero di Campioni	SCORE				Vitelli in FPT (%)
		0	1	2	3	
Frisona Italiana	41	11	15	11	4	27
Reggiana	32	0	4	13	15	0
Bianca Modenese	29	0	0	10	19	0
Piemontese	25	2	2	14	7	8

Grafico 3 Confronto fra le razze dal punto di vista della distribuzione degli score.



Nei Grafici 4 e 5 vengono messi a confronto gli score medi delle 4 razze bovine.

Grafico 4 Score medi di razza a confronto e cutoff adottato.

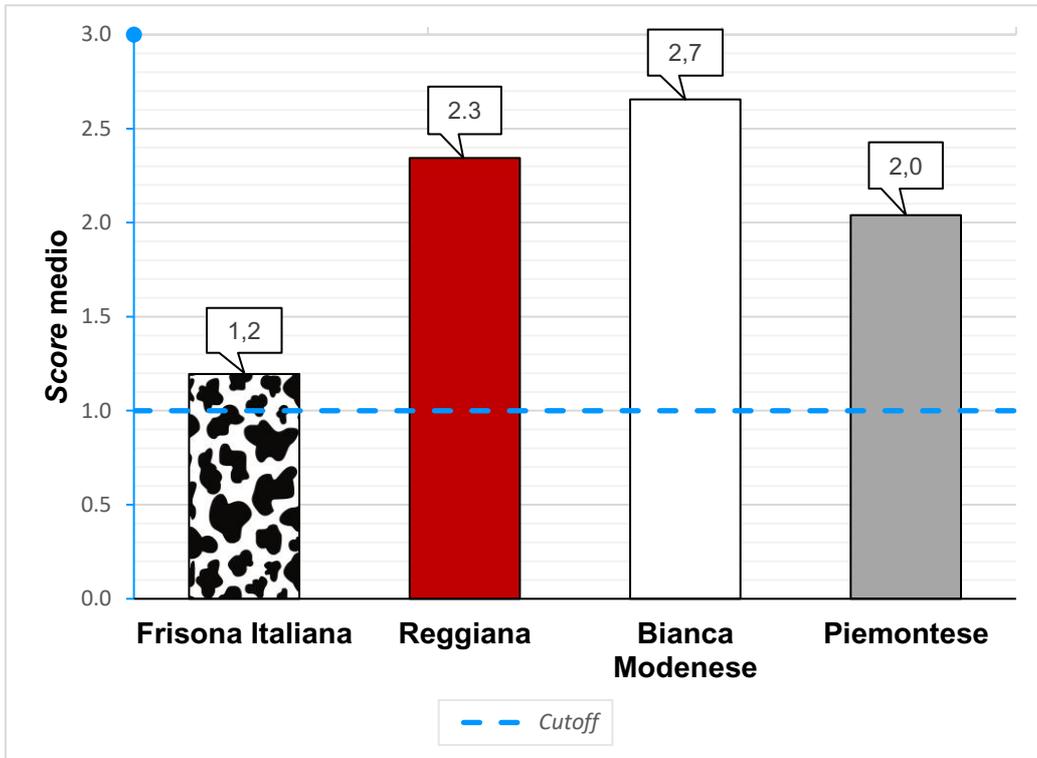
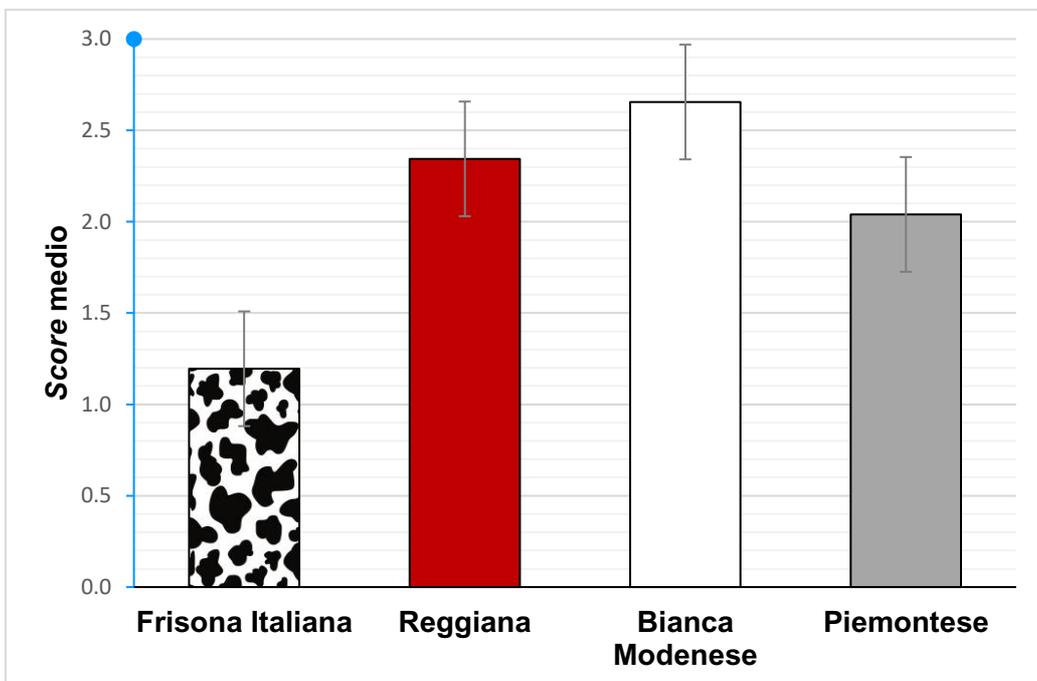


Grafico 5 Score medi di razza a confronto con relativi errori standard.



In Tabella 6 riportiamo lo score medio per ciascuna razza, con relativo errore standard e l'ampiezza dell'intervallo fiduciale; quest'ultimo è stato calcolato con una confidenza del 95%.

Tabella 6 Score medi di razza, con relativi intervalli di confidenza.

RAZZA	Numero di Campioni	Score medio	Errore Standard	Intervallo di confidenza del 95% (\pm)
Frisona Italiana	41	1,2	0,15	0,3
Reggiana	32	2,3	0,25	0,3
Bianca Modenese	29	2,7	0,09	0,2
Piemontese	25	2,0	0,17	0,3

Nella Tabella 7 riportiamo gli esiti del test t, derivante dal confronto fra ciascuna razza con le altre oggetto dello studio. Le differenze fra le 4 razze sono risultate essere statisticamente significative in tutti i confronti, tranne per quello fra Reggiana e Piemontese.

Tabella 7 Valori del test t di Student effettuato confrontando fra loro le razze dal punto di vista degli score attribuiti con il test di precipitazione in sodio solfito. Abbiamo evidenziato in blu i valori che sono risultati essere statisticamente significativi, ovvero per "stat t > al t critico a due code" e per "valore p < al valore alfa (0,05)"

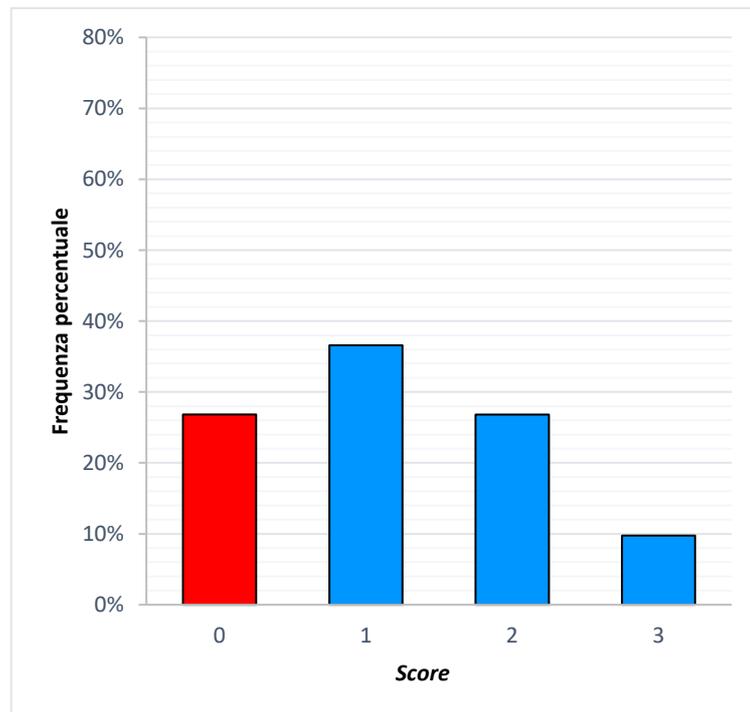
	Stat t	t critico a due code	Valore p del raffronto fra le razze	Significatività statistica (per p < 0,05)
Reggiana VS Frisona Italiana	5,93	1,99	0,000	Sì
Bianca Modenese VS Frisona Italiana	8,39	2,00	0,000	Sì
Piemontese VS Frisona Italiana	3,76	2,00	0,000	Sì
Reggiana VS Piemontese	1,45	2,01	0,152	No
Bianca Modenese VS Reggiana	2,04	2,00	0,047	Sì
Bianca Modenese VS Piemontese	3,23	2,03	0,003	Sì

15.1 Razza Frisona Italiana

Lo *score* medio ottenuto dall'analisi dei 41 campioni di siero dei vitelli di razza Frisona Italiana è stato di 1,2.

Nel Grafico 4 è riportata la distribuzione delle frequenze percentuali per i vari punteggi; abbiamo evidenziato in rosso la colonna dell'istogramma equivalente al punteggio/*score* 0, ovvero i vitelli risultati essere in FPT. La condizione di FPT (*score* 0) è stata registrata nel 27% dei vitelli frisoni (11 campioni). Il 37% dei campioni ha fatto registrare un punteggio ritenuto sufficiente (*score* 1), un altro 27% ha restituito uno *score* 2; infine, solo il 10% dei vitelli ha raggiunto il punteggio massimo (*score* 3).

Grafico 6 Distribuzione delle frequenze percentuali dei 41 sieri di vitelli di razza Frisona Italiana, catalogati secondo i punteggi attribuiti mediante test di precipitazione in sodio solfito.

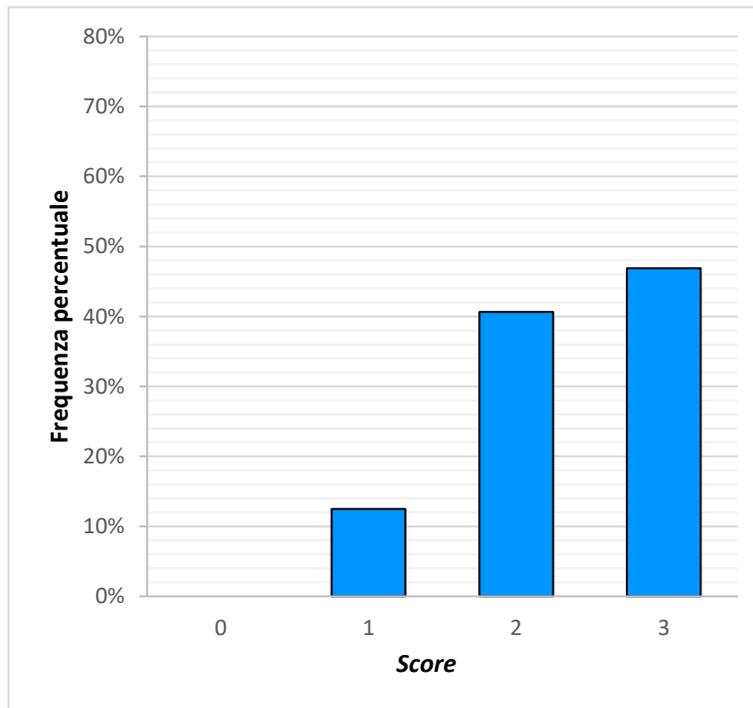


15.2 Razza Reggiana

I 32 sieri provenienti da vitelli di razza Reggiana hanno restituito uno *score* medio di 2,3.

Nel Grafico 4 è riportata la distribuzione delle frequenze percentuali della presente razza per i vari punteggi. Nessun vitello di razza Reggiana è risultato essere in FPT, solo il 13% ha fatto segnare uno *score* 1, il 41% ha restituito uno *score* 2 ed il 47% lo *score* 3.

Grafico 7 Distribuzione delle frequenze percentuali dei 32 sieri di vitelli di razza Reggiana, catalogati secondo i punteggi attribuiti mediante test di precipitazione in sodio solfito.

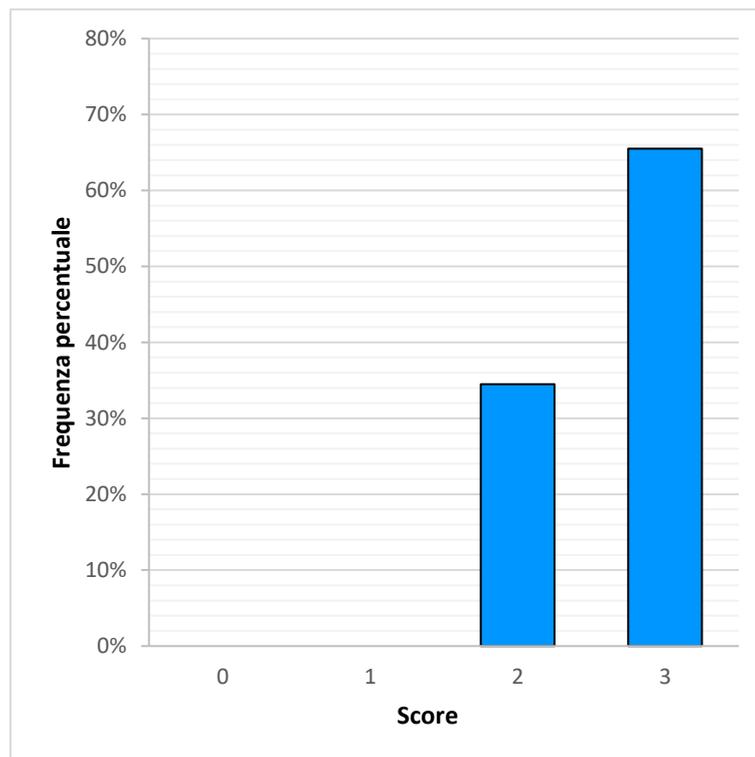


15.3 Razza Bianca Modenese

I sieri dei 29 vitelli di razza Bianca Modenese hanno fatto registrare uno *score* medio pari a 2,7.

Nel Grafico 5 riportiamo la distribuzione delle frequenze percentuali per i vari punteggi. Come per la razza Reggiana, anche per la Bianca Modenese non abbiamo rilevato alcuna condizione di FPT fra i vitelli. Inoltre, nessuno dei campioni ha restituito uno *score* 1. Il 34% ha fatto registrare uno *score* 2 e ben il 67% uno *score* 3.

Grafico 8 Distribuzione delle frequenze percentuali dei 32 sieri di vitelli di razza Reggiana, catalogati secondo i punteggi attribuiti mediante test di precipitazione in sodio solfito.

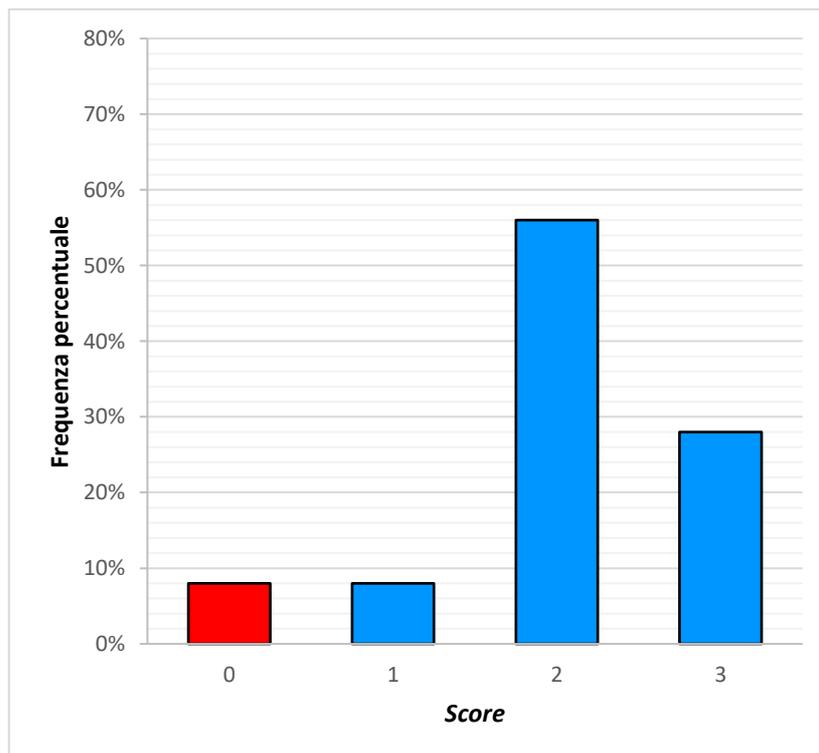


15.4 Razza Piemontese

I sieri dei 25 vitelli di razza Piemontese hanno restituito uno *score* medio di 2,0.

Nel Grafico 6 riportiamo la distribuzione delle frequenze percentuali per i vari punteggi; evidenziata in rosso troviamo la colonna dell'istogramma equivalente al punteggio/*score* 0, ovvero i vitelli risultati essere in FPT. La condizione di FPT (*score* 0) è stata registrata nell'8% dei vitelli piemontesi (solamente 2 campioni). Un altro 8% dei campioni ha fatto registrare uno *score* 1, mentre la maggior parte dei campioni si colloca agli *score* 2 e 3, rispettivamente il 56% ed il 28%.

Grafico 9 Distribuzione delle frequenze percentuali dei 32 sieri di vitelli di razza Reggiana, catalogati secondo i punteggi attribuiti mediante test di precipitazione in sodio solfito.



16 Risultati dell'analisi rifrattometrica dei colostri

Di seguito riportiamo i valori medi ottenuti dall'analisi rifrattometrica, in campo, dei campioni di colostro raccolti:

- Frisona Italiana (4 campioni): 21° Bx.
- Reggiana (3 campioni): 26° Bx.
- Bianca Modenese (3 campioni): 26° Bx.

La Figura 21 è un confronto fra due campioni colostrali, da noi raccolti, appartenenti a due diverse razze bovine (Bianca Modenese e Frisona Italiana).



Figura 20 Campioni di colostro prelevati alla prima mungitura dopo il parto da due bovine pluripare. Quello sulla sinistra è stato prelevato da una bovina Bianca Modenese, quello sulla destra, invece, da una Frisona Italiana.

Dall'indagine condotta intervistando gli allevatori riguardo la produzione media di colostro da parte delle loro bovine alla prima mungitura dopo il parto ci viene riferito quanto segue. Le bovine di razza Frisona Italiana produrrebbero fra i 3,5-4 L di colostro alla prima munta. Le bovine Reggiane avrebbero una produzione media di 2,5-3,5 L, con livelli inferiori, in genere, da parte delle primipare. Lo stesso vale per le Bianche Modenesi che si attesterebbero, invece, su una secrezione che va dai 2,5-3 L.

DISCUSSIONE

Prima di fare considerazioni legate ai risultati ottenuti teniamo a precisare un aspetto legato al test di precipitazione in sodio solfito e a come interpretare i risultati. Tale metodica di analisi, in virtù dell'impiego di 3 diverse concentrazioni di soluzione test, viene ritenuta, fra le semi-quantitative, quella che è in grado di catalogare meglio i sieri dei vitelli. (40) Al ridursi della concentrazione della soluzione di sodio solfito impiegata, il quantitativo di IgG sieriche necessarie a far sviluppare un precipitato di adeguata torbidità aumenta. *Score* via via superiori sono quindi indicativi di titoli anticorpali più elevati. (19) In letteratura si riporta che i titoli anticorpali in grado di far sviluppare un precipitato di adeguata torbidità alle soluzioni meno concentrate siano particolarmente elevati e difficilmente raggiunti dai vitelli da latte. Infatti, in uno studio condotto sulle razze bovine da latte, solo il 37% ed il 2% dei campioni avrebbero sviluppato torbidità con le soluzioni al 16% ed al 14%, rispettivamente. (19) Vi è quindi una correlazione diretta fra i punteggi restituiti da tale test e le effettive concentrazioni anticorpali sieriche. (19) (5) Per sapere però, con precisione assoluta, quali siano gli effettivi titoli anticorpali dei vitelli campionati li si dovrebbero analizzare con metodiche più specifiche, quali l'immunodiffusione radiale, che viene ritenuta il *gold-standard*. (37) (4)

Alla luce di quanto riportato in letteratura, possiamo ritenere che gli *score* restituiti dal test di precipitazione in sodio solfito siano ben correlati con le concentrazioni sieriche. Non dubitiamo quindi dell'accuratezza e della validità delle analisi da noi condotte impiegando tale metodica.

Riguardo allo studio che abbiamo condotto possiamo inoltre affermare che, data la dimensione del campionamento (127 sieri in totale) ed il numero di aziende coinvolte (14 in tutto), nell'arco di quasi 2 anni, si possa ritenere valida l'inferenza statistica dei risultati riguardo le 4 razze bovine considerate.

A proposito delle aziende coinvolte nello studio possiamo affermare che tutte hanno posto un'attenzione nella gestione dei vitelli da ritenersi buona e in certi casi anche ottima. Gli allevatori si sono dimostrati, inoltre, sempre disponibili ed attenti nel seguire quanto gli veniva consigliato dal medico veterinario per accudire i vitelli. La selezione che abbiamo fatto delle aziende è un elemento che teniamo a sottolineare, poiché mal pratiche di gestione dei vitelli avrebbero determinato, inevitabilmente, titoli anticorpali scadenti e avrebbero falsato lo studio. Di fatto, come riportato in letteratura, un'errata colostratura, non che la mancanza delle norme igienico sanitarie nella somministrazione del colostro, sono elementi che portano ad avere un minor trasferimento di Ig al vitello, con quadri di FPT e sviluppo di diarree neonatali. (19) (5) (29)

Per quanto la gestione della vitellaia da parte degli allevatori possa essere buona è comunque impensabile pretendere la perfezione nella cura dei singoli animali, soprattutto con aziende di medie-grosse dimensioni. Per questo, prima di procedere con il prelievo ematico dai vitelli ci siamo premurati di verificare che gli animali avessero ricevuto tutto il colostro materno nelle prime 4-6 ore di vita. Nel caso ciò non fosse avvenuto con certezza escludevamo il soggetto dal campionamento.

Come si può ben vedere dai risultati delle analisi, nessuna delle 4 razze ha fatto registrare, mediamente, un punteggio inferiore al *cutoff* (*score* 1). Anche la razza Frisone Italiana, che è quella che stimiamo abbia i titoli anticorpali più bassi (*score* medio di razza pari a 1,2), risulta essere, mediamente, al di sopra del *cutoff*. Possiamo dunque affermare che, in termini di popolazione complessiva, i vitelli di suddetta razza siano sufficientemente protetti dagli anticorpi colostrali.

Abbiamo quindi modo di ritenere che i risultati avvalorino la corretta esecuzione dello studio e che il "fattore umano" non sia stato elemento limitante il trasferimento di immunità passiva dalle bovine ai vitelli da noi campionati.

Prima di iniziare questa ricerca avevamo notato che, fra i diversi allevamenti, i vitelli di razza Reggiana e Bianca Modenese apparivano più vitali di quelli frisoni e avevano un accrescimento maggiore. Più in particolare avevamo osservato che l'incidenza delle diarree neonatali era fra essi minore e, soprattutto, meno debilitante per gli animali. Suddetti vitelli riuscivano poi spesso ad affrontare la malattia senza necessitare dell'intervento del veterinario. Notando queste differenze in più aziende, anche all'interno dello stesso allevamento, avevamo modo di ritenere che non vi fossero, solamente, cause di natura umana alla base (errata colostratura degli animali e norme igienico-sanitarie scadenti). Ma, supponevamo, che fattori interni alla singola razza bovina fossero in grado di determinare una maggiore o minore resistenza da parte dei vitelli alle malattie neonatali. Il semplice termine "rusticità" non poteva però giustificare queste osservazioni. Come sappiamo, sia che un vitello sia di razza Reggiana piuttosto che Frisona, nasce comunque privo di difese immunitarie specifiche ed è la madre a doverle fornire mediante il colostro. (1)

Riguardo al colostro bovino sono stati fatti diversi studi e quello che emerge è che la genetica, interna alla singola razza bovina, giochi un ruolo fondamentale nella sua composizione. (9) (21) Inoltre, alcuni autori riportano che vi sia una correlazione inversa fra la produzione quantitativa lattea e la qualità del colostro, intesa come suo contenuto anticorpale. (24) (11) (25)

Sulla base di queste evidenze abbiamo deciso di condurre il presente studio, con lo scopo di trovare una risposta alla seguente domanda. Se la selezione genetica per la produzione lattea ha determinato, involontariamente, un cambiamento diretto sul colostro, in che modo ha inciso sul trasferimento passivo anticorpale nel vitello?

Supponevamo di trovare delle differenze statisticamente significative fra la Frisona Italiana e le altre 3 razze, più rustiche e dall'attitudine lattifera non così spiccata. E credevamo che alla base vi fosse proprio una differente qualità del colostro. Possiamo dire che i risultati ottenuti abbiano più che atteso le nostre aspettative in tal senso.

Con uno score medio di 1,2 i vitelli frisoni, appartenenti ad una razza altamente selezionata per la produzione lattea, sono risultati essere nettamente inferiori a

quelli delle altre tre per copertura anticorpale (si vedano le tabelle ed i grafici precedenti sui confronti fra le razze). Di fatto, com'è possibile vedere nel precedente Grafico 3, tutte e quattro le razze presentano una distribuzione a campana, ma i vitelli frisoni, centrandosi sulla parte sinistra del grafico, mostrano una tendenza che si discosta molto dagli altri. La loro moda (lo score che si presenta con maggior frequenza) è rappresentata dallo score 1, restituito dal 37% dei campioni totali, contro il 13% dei vitelli reggiani, lo 0% dei modenesi e l'8% dei piemontesi. Confrontando la Frisona (mediante test t di Student) con ciascuna delle altre tre razze abbiamo sempre ottenuto un $p\text{-value} = 0,000$ che è abbondantemente al di sotto del livello di significatività adottato ($\alpha = 0,05$). Questo ci permette di affermare con una probabilità dello 0,0% che le differenze evidenziate siano dovute al caso.

Riguardo ai vitelli frisoni, abbiamo rilevato una percentuale di soggetti in FPT pari al 27%, al di sotto di quanto riportato in altri studi (35% (5) - 41% (9)). Questo dato è giustificabile con il fatto che abbiamo praticamente eliminato il fattore umano quale causa di un mancato trasferimento di immunità passiva nei vitelli. Come detto in precedenza, abbiamo avuto cura di verificare che tutti i vitelli campionati avessero assunto il colostro materno entro le prime 4-6 ore di vita. Dal momento che eravamo certi di questo, ci siamo quindi domandati come mai avessimo comunque una tale percentuale di vitelli in FPT. In seguito ad una colostratura adeguata non ci si attenderebbe di avere soggetti in tale condizione.

In uno studio condotto su bovine di razza Frisona Italiana, si riporta una carenza anticorpale primaria del colostro nel 17% dei campioni esaminati (5). Parrebbe addirittura che fino ad un 30% delle frisone statunitensi non raggiungano la soglia minima dei 50 g/L di IgG nel colostro. (17) Questi dati potrebbe giustificare quindi, in buona parte o completamente, la carenza anticorpale rilevata nel 27% dei nostri vitelli di suddetta razza. Logicamente, se il colostro è qualitativamente povero di Ig l'intestino del vitello non ha modo di assimilare un ammontare sufficiente di immunoglobuline per raggiungere la soglia protettiva.

Diversi studi affermano che le frisone abbiano un colostro qualitativamente inferiore alle altre razze; anche fra le sole da latte è quella con i valori più bassi per il

contenuto immunoglobulinico (5,6% (9)). Il nostro, seppur ridotto, campionamento ha confermato questo aspetto. Mediamente, i campioni di colostro di Frisona Italiana hanno fatto registrare un contenuto anticorpale equivalente a 21° Bx; un valore che si può ritenere di poco al di sopra del valore soglia della sufficienza (50 g/L di IgG (20).)

Ma perché si verifica questo fenomeno, contrario a quello che dovrebbe essere favorito in natura? Ovvero, perché le bovine altamente selezionate da latte producono un colostro povero in IgG? In base anche a quanto riportato da altri autori, possiamo avanzare 2 ipotesi, che possono essere vere entrambe poiché riconoscerebbero un'origine comune, l'eccessiva selezione genetica operata sui bovini da latte. La prima ipotesi è già documentata e avanzata in altri lavori, la seconda è invece frutto di riflessioni personali.

1. Selezionando le bovine per ottenere, sempre più, montate latte precoci e produzioni elevate, si sarebbe favorita una secrezione di colostro che, nella composizione, è più simile al latte. (24) (10) Il fatto di avere dei colostri somiglianti al latte lo avevamo notato anche nei nostri campioni di razza Frisona, particolarmente bianchi alla vista e poco viscosi (vedasi la Figura 21).

Ancora, sempre a favore di tale teoria sulla "prepotenza produttiva", è da notare la quantità di colostro prodotta. È stato documentato che le bovine frisone ne producano attorno ai 4 L di colostro alla prima munta, se non di più. (25) (11) Non vi sarebbe però una secrezione proporzionata di immunoglobuline, per cui si assiste ad un effetto "diluizione" delle stesse. (10) (24) (11) Anche questo fattore lo avevamo riscontrato negli allevamenti da noi seguiti per lo studio; i valori Brix registrati per i colostri di Frisona era tendenzialmente bassi e si aggiravano tutti attorno ai 21°Bx.

Una spiegazione plausibile di questo fenomeno potrebbe essere la seguente. Per trasferire le IgG dal torrente circolatorio al secreto della ghiandola mammari è necessario che sulle cellule mammarie vi siano recettori dedicati. Tali recettori vengono espressi in maggior misura grazie agli ormoni che agiscono nella prima fase di lattogenesi (estrogeni e progesterone), ma non nella seconda, ovvero quando vi è la montata latte. Un'anticipazione della montata latte porterebbe ad uno spostamento nell'equilibrio ormonale a favore della prolattina, con una riduzione precoce, invece, dei livelli di estrogeni e progesterone. (2) (24) Questo

spiegherebbe perché le bovine “da latte” producano grandi quantitativi di colostro e dal basso contenuto anticorpale.

2. Una carenza amminoacidica nella bovina a fine gestazione - inizio lattazione. Dalle nozioni che si hanno sull'attività metabolica delle bovine e grazie agli articoli analizzati, va considerato infatti quanto segue. La produzione di latte è prioritaria per la bovina e l'organismo indirizza gli elementi nutritivi verso la sintesi delle sue componenti, mandando in deficit gli altri distretti organici. Focalizzando la nostra attenzione sugli amminoacidi, che sappiamo essere i precursori delle proteine, nel caso delle bovine in lattazione la proteina la cui sintesi è ritenuta di prioritaria importanza da parte dell'organismo è la caseina. Se la bovina non ha amminoacidi sufficienti per la sua sintesi, non ne avrà a disposizione per funzioni metaboliche quali l'immunità. Per esempio, in caso di *deficit* energetico e proteico si osserva un'atrofia del tessuto linfoide. Gli amminoacidi, però, non sono impiegati solamente per la sintesi di proteine, la bovina può impiegarli anche per ricavare il glucosio da destinare alla produzione di energia per le cellule, oppure sintetizzare lattosio per produrre latte. Sappiamo anche che gli anticorpi sono di natura proteica e che per essere sintetizzati dalle cellule del sistema immunitario esse necessitano di glucosio e amminoacidi. (51) (4)

Un'ipotesi che ci viene da formulare è che le razze altamente selezionate per il latte, proprio in virtù delle elevate e precoci produzioni, possano presentare una ridotta sintesi anticorpale, secondaria ad una carenza amminoacidica. Supponiamo, che questa possa essere dovuta al loro impiego per la sintesi di altre proteine, ritenute più importanti dall'organismo della bovina (quali le caseine). Ma non solo, questa carenza amminoacidica potrebbe essere secondaria anche ad una carenza energetica; nel caso di un marcato bilancio energetico negativo, la bovina impiegherebbe, infatti, gli amminoacidi per ricavare energia.

Ribadiamo però che questa non debba essere ritenuta altro che un'ipotesi, frutto di una serie di considerazioni. Andrebbero condotti studi comparativi fra i *deficit* delle bovine nel peri-parto, i titoli sierici anticorpali e il dosaggio delle immunoglobuline nel colostro.

Nell'insieme, la prima motivazione che chiamiamo in causa per spiegare i bassi titoli anticorpali evidenziati nei vitelli frisoni è il colostro materno; del quale la bovina secerne grossi volumi ma dalla ridotta concentrazione anticorpale.

Passiamo ora ad analizzare il trasferimento passivo anticorpale dalla parte del vitello. In merito sempre alle elevate quantità di colostro, più simile al latte, che i vitelli frisoni si ritrovano ad assumere alla prima poppata, vanno evidenziati altri 3 aspetti. Questi, sommandosi ai precedenti, spiegherebbero ulteriormente la minore copertura anticorpale che abbiamo notato in tale razza.

1° È stato visto che la capacità degli enterociti di trasportare macromolecole dal lume intestinale al circolo ematico è un processo che viene sfavorito all'aumentare del quantitativo di ingesta nel lume intestinale. A parità di concentrazione anticorpale vengono assorbite meglio le IgG da 1 L di colostro che non da 2 L. (27) (35) I vitelli frisoni, però, anche quando assumono colostro di buona qualità, si trovano a dover assorbire le Ig da 4 L di ingesta, contro i 2-3 L che bevono normalmente i vitelli di altre razze. (35) (27) È logico quindi pensare che i vitelli da latte, a causa dei grossi volumi colostrali che assumono, siano "svantaggiati" nell'assimilazione anticorpale rispetto agli altri.

Alcuni consigliano di frazionare il colostro materno in 2 pasti da 2L, il primo entro le 6 ore dalla nascita ed il secondo entro le 6 successive; questa potrebbe essere una soluzione per ovviare alla somministrazione di volumi eccessivi di colostro. Tuttavia, viene ribadito anche che sia una pratica che può andar bene nel caso di colostri di qualità elevata. (26) È poi risaputo che passate le 6 ore di vita la capacità di assorbire macromolecole intatte, da parte degli enterociti, sia particolarmente bassa. (27) Riteniamo quindi che il problema sussista, anche con questa soluzione più che altro "palliativa".

2° La barriera intestinale dei vitelli neonati non è selettiva come quella di altre specie e le diverse macromolecole competono per gli stessi recettori. Ne consegue che il quantitativo di immunoglobuline assorbito sia inversamente proporzionale alla concentrazione di macromolecole presenti nel lume intestinale. (35) Come detto in precedenza, la secrezione del colostro da parte delle bovine frisone

parrebbe aver subito un cambiamento, quali-quantitativo, che lo ha portato ad assomigliare alla composizione di un latte di transizione più che a colostro. (10) (9) (11) Avendo un maggior ammontare di macromolecole in soluzione, che competono con i siti recettoriali per gli anticorpi, l'assorbimento di questi ultimi verrebbe ulteriormente sfavorito. (35)

3° In letteratura ritroviamo un'ulteriore ipotesi, sempre connessa alle precedenti e che, se fosse avvalorata da studi mirati, sarebbe in grado di spiegare ulteriormente questa condizione di ridotta copertura anticorpale notata nei vitelli di razza Frisona Italiana. S. Cavirani riporta, in un suo articolo, segnalazioni di diarree neonatali precocissime, che non sarebbero compatibili con le tempistiche necessarie alle infezioni microbiche per determinare i primi segni di malattia. Dall'indagine anamnestica avrebbe evidenziato si trattava di vitelli provenienti da aziende da latte, la cui produzione latte era accreditata da elevati indici di caseificazione. È arrivato, così, a supporre che la causa della diarrea potrebbe essere proprio il colostro prodotto dalle bovine, troppo ricco in caseine e quindi indigesto per i vitelli appena nati. Si verrebbe ad avere così una condizione di diarrea neonatale precocissima da "indigestione" di questo colostro/latte "pesante". (10) Anche questa diarrea da "indigestione" potrebbe inserirsi nel discorso sull'FPT. Infatti, perché la digestione e l'assorbimento dei nutrienti presenti nell'alimento siano efficienti, è necessario che il colostro/latte passi attraverso l'intestino nel giusto volume e transiti con la velocità idonea, permettendo così agli enzimi digestivi di agire al meglio sull'alimento e agli enterociti di assorbire i nutrienti. (30) Se però questo "latte di transizione" determina nel vitello neonato una diarrea di natura alimentare, a causa dell'aumentato transito intestinale, l'assorbimento delle immunoglobuline viene penalizzato, determinando una condizione di FPT. Anche in questo caso, il fenomeno sarebbe una conseguenza dell'eccessiva selezione genetica delle bovine per la produzione latte. Ribadiamo però il fatto che non sono stati fatti lavori scientifici mirati in merito a tale ipotesi. Sulla base di un'approfondita analisi possiamo ritenere, però, che se si indagasse più a fondo, il fenomeno potrebbe essere confermato.

Qualcuno potrebbe obiettare quanto espresso, affermando che i vitelli, essendo neonati lattanti, dovrebbero essere in grado, comunque, di digerire questo “colostro-latte pesante”. Quindi che la teoria della diarrea da mal digestione sia confutabile. Affermando questo si dimenticano però alcuni aspetti legati alla fisiologia della digestione del vitello neonato:

1° È vero che nello stomaco dei vitelli le k-caseine vengono precipitate da enzimi dedicati, formando così un coagulo che viene lentamente degradato; in questo modo il transito intestinale viene regolato. (30) Tuttavia, diversi studi riportano di grossi quantitativi di colostro prodotto dalle bovine da latte, tal volta si parla anche di 6 L (11). Nessuno si è mai premurato di verificare quale sia il corretto volume di ingesta che lo stomaco di un vitello è in grado di digerire adeguatamente. A proposito di questo, alcuni autori affermano che i vitelli delle razze da latte spesso si saziano prima di ingerire tutto il colostro materno. (9) (26) Ecco quindi che se si sovraccarica un vitello con troppo “colostro-latte pesante”, la digestione non avviene in modo idoneo e si determina un’indigestione nel piccolo.

2° Nel vitello fino a 2 giorni di vita le secrezioni pancreatiche sono meno efficienti. Il deficit di tripsina, enzima fondamentale per scindere ulteriormente le proteine, è fondamentale per evitare che le Ig (macromolecole proteiche) si degradino. (30) (9) Tuttavia, allo stesso modo delle immunoglobuline anche altre macromolecole proteiche permangono intatte nel lume intestinale. Ritorniamo quindi sempre al discorso dell’antagonismo fra macromolecole per i siti recettoriali (35) e alla diarrea alimentare per la presenza di sostanze indigerite nel lume enterico. (10)

Tutte queste evidenze ci portano a suggerire che andrebbero condotti studi più approfonditi sul colostro delle bovine altamente selezionate da latte. Nonché sulle capacità digestive dei vitelli neonati.

Analizzando quanto discusso fino ad ora qualcuno ci potrebbe chiedere perché avanziamo tali ipotesi solamente per le razze altamente selezionate per la produzione latte e non per tutte quelle con attitudine lattifera, come per le razze

“duplice attitudine”, quali la Reggiana e la Bianca Modenese. Sappiamo infatti che il latte di queste due razze è molto più ricco in proteine e caseine rispetto a quello della Frisona Italiana. (44) Applicando i concetti precedentemente espressi a tutte e tre le razze qui citate si potrebbe pensare, erroneamente, che i vitelli di Reggiana e Bianca Modenese presentino problematiche maggiori di FPT e ridotta copertura anticorpale. Dal nostro studio abbiamo però notato che ciò non si verifica e questo sarebbe in virtù di 2 aspetti:

1° Reggiana e Bianca Modenese, producendo meno latte durante la lattazione, necessitano, complessivamente, di meno amminoacidi ed energia per far fronte alle richieste della ghiandola mammaria rispetto alla Frisona. Facendo qualche conto, con una produzione di 5.650 Kg di latte ed un contenuto proteico medio del 3,45% (36), le bovine di razza Reggiana, in una lattazione intera, secernono circa 195 Kg di proteine nel latte. Facendo lo stesso calcolo per quelle di Bianca Modenese, che producono, mediamente, 5.165 Kg di latte, con un contenuto proteico del 3,47% (47), otteniamo che queste secernono circa 179 Kg di proteine in totale. Se andiamo a vedere, invece, i dati della Frisona Italiana, per produrre 10.097 Kg di latte, con un 3,36% di proteina (45), la ghiandola mammaria di queste bovine deve secernere ben 339 Kg di proteine, che è quasi l'80% in più rispetto alle 2 precedenti. Ne deriva, che le vacche appartenenti alle prime due razze riescano a coprire meglio i fabbisogni fisiologici e produttivi in lattazione, ed il sistema immunitario non sia, quindi, così penalizzato nella sintesi anticorpale.

2° Grazie alle conoscenze in merito ai trascorsi storici delle due razze autoctone possiamo spiegare anche un altro fattore differenziale con la Frisona. Reggiana e Bianca Modenese hanno subito un forte declino a metà del secolo scorso e solamente negli ultimi anni sono state oggetto di politiche di salvaguardia. (36) Essendo state catalogate come razze meno produttive, prima, e come da salvaguardare, poi, non sono state oggetto di un'intensa selezione genetica. Conseguentemente, la loro montata lattea non è dirompente come quella della Frisona, né in termini quantitativi né di picco di lattazione, il quale è più distante dal parto. (46) (47) Le bovine di suddette razze hanno mantenuto quindi inalterata la loro naturale attitudine a produrre colostro per il vitello, conservandone la composizione fisiologica che dovrebbe avere. Proprio per questo aspetto non è

inoltre indigesto per i vitelli, che riescono ad assimilarne al meglio la componente immunoglobulinica.

Abbiamo anche dati parziali in grado di confermare quanto sosteniamo. Parlando con gli allevatori ci viene riferito che le bovine di razza Reggiana producano dai 2,5 ai 3,5 L di colostro, dai 2,5 ai 3 L quelle di razza Bianca Modenese invece. Inoltre, dall'analisi rifrattometrica che abbiamo condotto personalmente, il colostro delle due razze autoctone è sempre risultato qualitativamente superiore a quello delle Frisone. Osservandolo (vedasi la Figura 21) si può ben notare il caratteristico aspetto "giallognolo" e denso che dovrebbe avere.

Riguardo al colostro di Reggiana e Bianca Modenese, non vi sono dati in letteratura e il nostro ridotto campionamento non può di certo ritenersi tale da permettere un'inferenza sulle due razze. Tuttavia, questi primi dati, particolarmente incoraggianti, ci portano a suggerire di svolgere ulteriori ricerche in merito. Crediamo che sarebbe interessante confrontarne la composizione quali-quantitativa con il colostro di Frisona.

Con questo studio intendevamo ricercare come l'attitudine lattifera potesse incidere sulla copertura anticorpale nel vitello. Anche se è vero che con le moderne conoscenze nel campo della genetica l'attività di selezione ha visto un balzo notevole, in realtà è da secoli che l'uomo la attua sui bovini. Si distinguono così razze ad attitudine "da latte", "duplice attitudine" e "da carne"; queste ultime producono latte sufficienti a sfamare il vitello, mentre quelle "da latte" ne producono indubbiamente molto di più. Come nel caso della razza Frisona che ha raggiunto i livelli produttivi maggiori, a differenza di Reggiana e Bianca Modenese, le quali vengono comunque allevate per il latte. (36)

Dal momento che Reggiana, Bianca Modenese e Piemontese hanno riportato *score* nettamente superiori alla Frisona Italiana, avvalorati da significatività statistica (p -value = 0,000), ci aspettavamo di trovare differenze significative anche nel raffronto fra le due razze "duplice attitudine" con quella "da carne".

Partiamo confrontando le due razze “a duplice attitudine” (Reggiana e Bianca Modenese). I vitelli di modenese hanno passato egregiamente il test di precipitazione in sodio solfito, con punteggi che non sono mai stati inferiori al 2 e con ben il 67% dei campioni che ha raggiunto quello massimo possibile (ovvero il 3). I vitelli di reggiana, sebbene abbiano statistiche molto buone, non li eguagliano (si vedano i grafici e le tabelle precedenti). Questo era atteso, la razza Reggiana è considerata “a duplice attitudine” ma rispetto alla Bianca Modenese è più vocata per la produzione lattea che non di carne. In linea con la nostra ipotesi, i vitelli di quest’ultima razza hanno restituito uno *score* medio di 2,7 contro il 2,3 dei primi. Possiamo quindi osservare che vi sia una differenza a sfavore della razza Reggiana, confermata da una differenza statisticamente significativa (*p-value* di 0,047) al test *t* di Student, anche se di poco al di sotto del livello di significatività adottato ($\alpha = 0,05$).

Quando abbiamo analizzato per la prima volta questi dati ammettiamo di essere rimasti tuttavia perplessi. Reggiana e Bianca Modenese sono entrambe a “duplice attitudine” e le produzioni non differiscono di molto in termini quantitativi. Abbiamo inoltre campionato i colostri delle due razze, che al rifrattometro sono risultati essere qualitativamente sovrapponibili. Tuttavia, non avevamo pensato subito a quanto colostro viene prodotto dalle bovine. Dalle interviste agli allevatori ci siamo accorti che la Bianca Modenese produce effettivamente meno colostro della Reggiana e che la sua montata lattea sia più tardiva rispetto a quest’ultima. Ancora una volta verrebbe da chiamare in causa proprio la quantità di colostro ingerita dal vitello in una singola poppata quale possibile fattore limitante la capacità intestinale di assimilare le immunoglobuline. (27) Abbiamo quindi evidenze a favore nella nostra ipotesi e dati, avvalorati da validità statistica, in grado di confermarle.

In ultima analisi ci si sarebbe dovuti aspettare che i vitelli di Piemontese, essendo figli di bovine “da carne”, fossero quelli con i titoli anticorpali maggiori. Sebbene siano superiori a quelli frisoni, come visto in precedenza, altrettanto non si può dire nei confronti delle altre due razze. I vitelli “piemontesi” hanno raggiunto un punteggio medio di 2,0 soltanto, contro il 2,3 dei “reggiani” e il 2,7 dei “modenesi”.

Fra Reggiana e Piemontese non vi è però una differenza statisticamente significativa poiché il *p-value* è di 0,152, che è abbondantemente al di sopra della soglia del 5%; si ha quindi il 15,2% di probabilità che la differenza sia dovuta al caso.

Confrontando la Piemontese con la Bianca Modenese, invece, otteniamo che la seconda non solo non sia inferiore, come ci aspettavamo prima di iniziare le analisi, ma che addirittura sia superiore ad essa. Chiamando ancora una volta in causa la statistica, osserviamo che il *p-value* ottenuto dal confronto fra le due razze sia di 0,03; ovvero, al di sotto della soglia adottata. I titoli anticorpali dei vitelli di Bianca Modenese sono quindi da ritenersi superiori a quelli di Piemontese con significatività statistica.

I risultati della Piemontese sono inattesi e non risultano in linea con quanto pensavamo di osservare. Di seguito esponiamo le riflessioni che abbiamo fatto al riguardo e che riteniamo possano spiegare quali complessi meccanismi abbiano portato ad avere questi risultati.

1° Una componente genetica. Sappiamo, che gli enterociti dei vitelli neonati esprimono FcRn in grado di captare le Ig dal lume intestinale; una volta che ciò è avvenuto, attraverso un processo a più fasi, gli anticorpi vengono trasferiti intatti al circolo ematico. (33) Dalle conoscenze che possediamo in merito alla biologia delle cellule animali sappiamo che le componenti cellulari, fra cui anche i recettori, vengono sintetizzate partendo dalle “informazioni” contenute nel DNA delle cellule stesse. Non è da escludere che fattori genetici intrinseci alla razza possano agire determinando una maggior o minore espressione degli FcRn sulla superficie degli enterociti dei vitelli. Di conseguenza, vi potrebbe essere anche una diversa capacità intrinseca dei neonati di assimilare gli anticorpi colostrali. Tale ipotesi è già stata avanzata anche da James D. Quigley, il quale riporta i dati di una ricerca condotta alimentando con colostri simili vitelli di razza Jersey e Frisona. Al termine dello studio si sarebbe osservata una capacità del 24% maggiore nei Jersey di assimilare le immunoglobuline rispetto ai vitelli Frisoni. (27) Non si può quindi escludere che la genetica agisca in tal senso, anche se, i dati in letteratura non sono sufficienti per accreditarla a pieno. Riteniamo che, per avere la certezza assoluta che questo sia vero, andrebbero condotti studi di genetica al riguardo.

Rimanendo sempre nell'ambito della genetica ricordiamo che la Piemontese ad oggi è selezionata solamente "da carne", ma che le sue produzioni lattee siano più che sufficienti per il vitello. Infatti, alcuni allevatori ancora le mungono per produrre formaggi tipici. (36) Questo potrebbe ben spiegare una sovrapposizione con le razze "a duplice attitudine", ma non l'"inferiorità" osservata rispetto alla Bianca Modenese.

Per studiare meglio la copertura anticorpale nei vitelli delle razze "da carne", suggeriamo che si potrebbero analizzare i sieri dei vitelli di razza Romagnola, la quale appartiene al ceppo podolico, molto più distante geneticamente dalle razze del nostro studio. In questo modo si può eliminare qualsiasi sovrapposizione genetica con le razze "a duplice attitudine".

2° Stress da parto. La razza Piemontese è attualmente oggetto di una selezione genetica volta ad una maggiore "facilità di parto", i parti distocici erano infatti frequenti in questa razza, rendendo necessari interventi di assistenza al parto da parte del veterinario. Le distocie sono frequenti in tale razza per due motivazioni. In primo luogo, vi è una problematica legata alle bovine, che presentano un canale del parto tendenzialmente stretto; inoltre, i vitelli sono caratterizzati da un'eccessiva muscolosità alla nascita. (36)

Alcuni studi hanno dimostrato come i vitelli che nascono in seguito a parti distocici e prolungati presentino minori concentrazioni sieriche di immunoglobuline. Questo perché risultano essere meno vitali e non hanno un riflesso di suzione adeguato. (19) (5) Ma non solo, secondo altri studi, il cortisolo (anche conosciuto come "ormone dello stress") inibirebbe l'*uptake* delle Ig a livello enterico. (33) Lo stress da parto nel vitello neonato è quindi qualcosa di riconosciuto e che riteniamo possa essere stato un fattore limitante nell'assimilazione anticorpale da parte dei vitelli piemontesi.

3° Tipologia di allevamento e assunzione del colostro da parte dei vitelli. Questo è il punto più ampio e complesso che abbiamo analizzato e che pensiamo possa essere in grado, assieme al precedente, di dare una valida spiegazione. La rimonta della razza Piemontese prevede la così detta "linea vacca vitello", ovvero i vitelli rimangono con la madre fino allo svezzamento ed è lei ad occuparsi

direttamente del piccolo. Nelle altre tre razze a maggior attitudine “da latte”, invece, i vitelli vengono allontanati dalla madre subito dopo il parto, o comunque entro 1-2 ore al massimo, ed è l'uomo ad occuparsi interamente di essi. Il primo pasto di colostro viene somministrato artificialmente dall'allevatore, il quale munge la madre e lo somministra, tramite sonda o biberon, al piccolo. Questa è una differenza di non poco conto, di fatto, non abbiamo avuto modo di verificare quanto colostro assumessero i vitelli piemontesi entro le 4-6 ore dal parto. Gli allevatori si sono limitati a vedere se stessero poppando dalla madre ma, come accennato in precedenza, vitelli nati da parti distocici hanno una suzione minore e un assorbimento enterico meno efficiente.

Si deve poi tenere conto della modalità di somministrazione. Le bovine da latte vengono munte direttamente dall'allevatore, il quale effettua la disinfezione della mammella (pre- e post- *dipping*) e impiega secchi adeguatamente sanificati per la raccolta del colostro. Così facendo non vi è contaminazione batterica dello stesso e si è certi che il vitello non ingerisca patogeni insieme al colostro. Le bovine piemontesi non vengono invece munte, per cui, nel momento in cui il vitello succhia il capezzolo, se questo è sporco, ingerisce anche i batteri presenti sulla sua superficie. Inoltre, a differenza di quanto avviene negli allevamenti da latte, i vitelli piemontesi vivono nello stesso box della madre, con un maggior rischio di trasmissione di patogeni dagli adulti ai piccoli. Dal momento che è stato dimostrato come la contaminazione batterica del colostro penalizzi il trasferimento passivo colostrale (28), riteniamo che queste differenze nella tipologia di allevamento possano aver inciso fortemente sui titoli anticorpali.

Alla luce di queste considerazioni è logico pensare che numerosi fattori abbiano penalizzato il trasferimento anticorpale dei vitelli piemontesi; non è quindi possibile fare un pieno raffronto con le altre razze. Tuttavia, la notevole superiorità osservata rispetto ai vitelli frisoni ($p\text{-value} = 0,000$) rimane; questi ultimi sono risultati inferiori sebbene siano stati allevati nelle migliori condizioni possibili. Questo dato è un'ulteriore dimostrazione a favore della nostra ipotesi e conferma il fatto che la spinta produttiva lattea nelle bovine giochi un ruolo notevole nel trasferimento passivo anticorpale.

Ritorniamo però a parlare un attimo del rischio di esposizione agli agenti patogeni negli allevamenti bovini. Come riportato in più articoli, i dismicrobismi a livello intestinale penalizzano l'assorbimento anticorpale. Gli autori ritengono che questi patogeni provengano da un colostro contaminato e consigliano, pertanto, pratiche per abbattere la carica microbica (9) (28). Parlando della razza Piemontese abbiamo però supposto anche che parlare solamente di "colostro contaminato" sia limitante; che dire a proposito di una "contaminazione ambientale"? È indubbio il fatto che i vitelli potrebbero ingerire tali microrganismi patogeni anche dall'ambiente in cui vivono, ed è infatti risaputo quanto siano importanti le corrette norme igienico-sanitarie nelle vitellaie. (26)

Nell'allevamento bovino i parti avvengono durante tutto l'anno e non vi è mai un completo vuoto sanitario delle vitellaie. Non è inusuale trovare vitelli appena nati accanto a soggetti di maggiore età, che potrebbero essere affetti da diarrea. Il contatto dei neonati con i vicini malati può facilmente esitare nell'ingestione, da parte dei primi, di materiale infetto, soprattutto se la carica microbica ambientale è elevata (conseguenza della presenza di numerosi soggetti in diarrea nella vitellaia). Come detto, le immunoglobuline colostrali, una volta giunte nel lume intestinale, interagiscono con i patogeni ingeriti neutralizzandoli ma, così facendo, non sono più disponibili per essere legate dagli FcRn e trasportate in circolo. (33) Non dimentichiamo poi che i batteri nocivi sono in grado di rilasciare enzimi che degradano parzialmente le immunoglobuline; se ciò avviene le IgG non vengono trasferite nel circolo ematico del vitello. (9)

Proprio sulla base di queste evidenze abbiamo riconsiderato la differenza osservata fra i vitelli "reggiani" e "modenesi". Il fatto che fosse dovuta, esclusivamente, ad una maggiore e minore attitudine lattifera da parte delle bovine delle rispettive razze non ci convinceva a pieno; parliamo, infatti, sempre di bovine "a duplice attitudine" e dalla produzione simile.

Prima di iniziare il nostro studio, nell'azienda di maggiori dimensioni che alleva bovine di razza Reggiana vi erano diversi problemi di diarrea neonatale, dettati da errate pratiche di colostratura dei vitelli. Per quanto la situazione sia migliorata, grazie al rispetto delle tempistiche per somministrare il colostro, vi è però ancora qualche sporadico caso di diarrea neonatale. Inoltre, abbiamo notato che gli igloo

dei vitelli sono posizionati direttamente sulla terra e non hanno un fondo ben sanificabile. Questi elementi ci fanno pensare che la carica microbica ambientale residua sia ancora elevata nei ricoveri e, di conseguenza, che l'ingestione accidentale di tali patogeni da parte dei vitelli possa aver interferito con l'assorbimento intestinale degli anticorpi. Di fatto, proprio i 4 vitelli di Reggiana che hanno registrato uno *score* 1 provengono da questa vitellaia.

All'interno del capitolo sulla contaminazione ambientale si inserisce anche la vaccinazione profilattica delle bovine, in asciutta, contro la diarrea neonatale del vitello. La quale è ormai di comprovata importanza, nelle aziende da latte, per prevenire tale sindrome nei vitelli. (5) Potrebbe esserlo a maggior ragione per aiutare ad abbattere la carica microbica ambientale; infatti, se le madri non vengono vaccinate in asciutta, i vitelli non assumono, mediante il colostro, gli anticorpi specifici verso gli agenti di enterite neonatale. Virus e batteri, trovando numerosi soggetti recettivi (vitelli che assumono pochi anticorpi e non specifici verso di essi) sono in grado di determinare, con maggior facilità, quadri di enterite neonatale (5); conseguentemente, la presenza di soggetti escretori determina un aumento della carica microbica nei ricoveri (Rotavirus, Coronavirus ed *E. coli*).

Gli unici allevamenti da latte del nostro studio che attuavano la vaccinazione sulle bovine in asciutta erano 3 dei 4 di Frisona Italiana. Nessuno dei vitelli di Reggiana e Bianca Modenese campionati è figlio di bovine vaccinate, eppure, i loro titoli anticorpali sono tendenzialmente superiori e lo stato di salute dei vitelli migliore. Vista la ridotta qualità del colostro chiamata in causa nelle razze altamente selezionate da latte, riteniamo che, a maggior ragione, la vaccinazione profilattica sia uno strumento indispensabile per proteggere i vitelli. Sarebbe però sbagliato pensare che nelle altre razze, in virtù della qualità superiore del colostro, la vaccinazione non sia necessaria. Anzi, proprio grazie alla loro maggior concentrazione naturale di Ab, aumentarne la specificità implementerebbe ulteriormente la protezione dei vitelli. Infatti, essi sono comunque esposti al rischio di infezione e non completamente immuni solamente in virtù della qualità colostrale.

Sappiamo poi che una colostratura tardiva predispone inevitabilmente alla diarrea neonatale e penalizza la crescita degli animali (10); anche con una buona gestione dei vitelli non è inusuale però che ciò si verifichi, come per quei soggetti che nascono di notte. Però, anche se tardivamente, colostro è comunque da somministrare poiché gli anticorpi liberi a livello di lume intestinale aiutano a combattere le proliferazioni microbiche. In tal senso può tornare utile, ancora una volta, la vaccinazione, dal momento che aumenta la specificità degli anticorpi liberi a livello enterico. (5)

Alcuni autori hanno ipotizzato anche che la vaccinazione delle bovine, determinando un effetto *booster* sugli anticorpi circolanti, porti ad un maggior trasferimento di immunoglobuline dal sangue alla mammella e quindi al colostro (9) (8). Si tratta al momento soltanto di un'ipotesi ma sarebbe un punto interessante da verificare; all'interno della stessa razza bovina si potrebbero fare prove di comparazione fra figli di vaccinate e non.

CONCLUSIONI

Alla base di un corretto trasferimento passivo colostrale è risaputo che vi siano numerosi fattori che interagiscono in modo articolato fra loro; la genetica non è mai stata approfondita in modo mirato se non con qualche sporadico studio sui colostri. Il presente lavoro si inserisce fra questi ed affronta l'argomento attraverso la valutazione dei vitelli stessi.

Il nostro obiettivo era quello di cercare, se vi fossero, variazioni di razza nell'immunizzazione passiva dei vitelli. Le quattro razze bovine analizzate (Frisona Italiana, Reggiana, Bianca Modenese e Piemontese) differiscono fra loro per attitudine produttiva ("da latte", "duplice attitudine" e "da carne") e livello di selezione genetica per la produzione latte.

In letteratura non si riporta di alcuno studio che, come il nostro, abbia messo a confronto le razze dal punto di vista dei titoli sierici dei vitelli; pertanto, la nostra ricerca è pilota in tal senso.

All'interno delle razze arruolate nello studio, l'unica per la quale esistono già numerosi dati in letteratura, con i quali è stato possibile fare dei raffronti, è la Frisona Italiana. Riguardo al 27% dei vitelli di suddetta razza da noi rilevati in FPT, riteniamo che tale condizione sia stata conseguente a due fattori, che hanno agito in modo indipendente. Il primo che chiamiamo in causa è una carenza anticorpale primaria del colostro; riteniamo, però, che vi sia anche una problematica di mancato/ridotto assorbimento intestinale dovuto ai grossi volumi di colostro e alla sua composizione "anomala", troppo simile al latte, che lo rende indigesto al vitello neonato. Questi due elementi riconoscerebbero una base comune, ovvero sarebbero una conseguenza della selezione genetica operata nelle razze bovine altamente specializzate "da latte" per aumentarne e migliorarne le produzioni.

Per quanto riguarda Reggiana, Bianca Modenese e Piemontese non vi sono studi riguardanti l'incidenza dell'FPT, così come per i titoli sierici anticorpali dei vitelli o la composizione del colostro. Tuttavia, il trasferimento passivo colostrale è un argomento che viene studiato da anni e sono stati condotti numerosi studi al riguardo. È stato dimostrato come influenze dovute al colostro delle bovine, alla sua gestione e somministrazione da parte degli allevatori, nonché a contaminazioni microbiche e fattori individuali, delle bovine o dei vitelli stessi, possano influenzare il trasferimento passivo colostrale. Tutti questi elementi sono stati presi in considerazione per valutare i nostri risultati e sono stati anche motivo di riflessioni.

Possiamo affermare, con una confidenza del 95%, che gli *score* medi delle 4 razze bovine analizzate siano i seguenti. Frisona Italiana: $1,2 \pm 0,3$; Reggiana: $2,3 \pm 0,3$; Bianca Modenese: $2,7 \pm 0,2$; Piemontese: $2,0 \pm 0,3$. I vitelli di tutte e 4 le razze sono da ritenersi adeguatamente protetti dagli anticorpi passivi colostrali, essendo, di fatto, mediamente al di sopra del *cutoff* stabilito (*score* 1), fatta eccezione per il limite inferiore della Frisona Italiana (0,9) che risulta al di sotto di tale soglia.

Per quanto i dati singoli di razza siano un primo indizio del fatto che vi sia effettivamente una differenza nella copertura anticorpale dei vitelli, hanno un'utilità ridotta se non vengono confrontati fra loro. È doveroso, infatti, vedere se vi sia significatività statistica per poter affermare che le differenze osservate non siano frutto del caso. Mediante impiego del test t di Student, e adottando un livello di significatività del 5%, otteniamo che Reggiana, Bianca Modenese e Piemontese siano statisticamente superiori alla Frisona Italiana; così come la Bianca Modenese nei confronti sia della Reggiana che della Piemontese. Fra queste ultime due, invece, la significatività statistica non è stata raggiunta, per tanto la differenza osservata potrebbe essere frutto del caso.

Tali risultati campionari vanno poi analizzati alla luce di quanto considerato in precedenza e di come è stato condotto lo studio. Abbiamo cercato di eliminare, per quanto possibile, ogni fattore limitante che non fosse dovuto alla razza bovina. Parlare però di razza e di tipologia di allevamento non è la stessa cosa, la Piemontese differisce molto per questo ultimo aspetto dalle altre e per quanto venga

allevata secondo una modalità più “naturale” (linea vacca vitello) e l’uomo non abbia voce in capitolo sulla colostratura dei vitelli, diviene per noi anche più difficile fare dei raffronti con i dati delle altre razze. Reggiana, Bianca Modenese e Frisona Italiana sono invece molto più standardizzate dal punto di vista dell’allevamento e della gestione dei vitelli, ne consegue che i raffronti fra queste siano da ritenersi molto più accurati.

Spesso si parla di somministrazione naturale e artificiale del colostro confrontando le razze “da carne” e quelle altamente selezionate “da latte”, ma che dire a proposito di quelle a duplice attitudine? Con il nostro studio potremmo aver dimostrato che la somministrazione artificiale sia molto più efficiente di quella naturale. La mungitura delle bovine permette di avere maggior standard igienici del colostro, limitando l’eventualità che il vitello ingerisca patogeni succhiando mammelle sporche o mastitiche. Inoltre, si è certi che il piccolo assuma un sufficiente ammontare di colostro entro le 4-6 ore dalla nascita, cosa che non è possibile verificare con l’assunzione spontanea e che nel caso di vitelli disvitali sarebbe una problematica di cui tener conto. È tuttavia un’arma a doppio taglio, l’allevatore deve saperla gestire al meglio dal punto di vista dell’igiene, delle tempistiche e somministrando in modo idoneo le giuste quantità.

Come affrontato nelle discussioni precedenti, sono numerosi i fattori che possono essere chiamati in causa per spiegare un ridotto trasferimento passivo colostrale, soffermandoci sull’elemento differenziale cardine della nostra ricerca, ovvero l’attitudine produttiva e la genetica della razza, le considerazioni da fare sono state tante. Possiamo affermare di essere riusciti a dimostrare che la precoce e abbondante montata latte ha ripercussioni negative sull’immunizzazione dei vitelli di razza Frisona. Gli esatti e complessi meccanismi alla base di questo fenomeno sarebbero molteplici e rimangono in parte da dimostrare ma in letteratura si riporta già di studi svolti in tal senso e che riteniamo siano da accreditare. Vanno infatti considerate sia le modifiche avvenute nella fisiologia della sintesi e

secrezione del colostro in termini quali-quantitativi, così come le ripercussioni sulle capacità assimilative e digestive dei vitelli stessi.

Passando da una razza altamente selezionata “da latte” (Frisona Italiana), per una “a duplice attitudine” ma più vocata alla produzione lattea (Reggiana), fino ad una meno produttiva, ma sempre “a duplice attitudine” (Bianca Modenese), abbiamo osservato un declino nell’immunizzazione dei vitelli. Tale ipotesi viene avvalorata dalla statistica ($p\text{-value} < 0,05$). L’unica che esce un po’ da questo schema è la razza “da carne” (Piemontese), ma riteniamo che i motivi per cui questo si potrebbe essere verificato siano tanti e non collegati strettamente all’attitudine produttiva. Quelli che accredtiamo maggiormente sono lo stress, conseguente ai parti distocici (frequenti in questa razza), ritardi nell’assunzione del colostro da parte dei vitelli, nonché la probabile ingestione di patogeni da parte dei neonati, con conseguenti dismicrobismi intestinali.

Sempre al fine di condurre lo studio nel modo più oggettivo e accurato possibile dobbiamo dire che la leggera significatività statistica osservata fra Reggiana e Bianca Modenese non ci convince del tutto. Di fatto, sono due razze molto vicine geneticamente e dall’attitudine produttiva praticamente sovrapponibile. La differenza osservata potrebbe essere dovuta, anche in questo caso, a dismicrobismi intestinali, secondari a differenti cariche microbiche ambientali nelle vitellaie. Ricordiamo, tuttavia, che la razza Reggiana è oggetto di selezione genetica per la produzione lattea, non lo è, invece, la Bianca Modenese, dal momento che il ridotto numero di capi non permette di attuare programmi di selezione, ma solo di salvaguardia della razza. Non è da escludere, quindi, che la selezione che si sta operando per la produzione lattea della Reggiana stia già manifestando i primi effetti sulle caratteristiche del colostro e sulle capacità assimilative dei vitelli.

Sappiamo che crescere un vitello sano voglia dire avere, un giorno, un/a bovino/a in salute e più produttivo/a. Si parla sempre di come le misure profilattiche e la gestione della colostratura da parte degli allevatori incidano su questo, ma non si pone mai l’attenzione su quella che è la naturale attitudine della razza a permettere che ciò avvenga nel modo migliore. Grazie alla presente ricerca abbiamo dimostrato

invece che genetica e attitudine produttiva siano elementi di non poco conto. L'allevatore non ha modo di controllarli e si trova spesso impotente di fronte a colostri diluiti e di bassa qualità, dovendo arginare, più che altro, il vero problema. Le ripercussioni che gli elevati livelli produttivi delle bovine "da latte" hanno sullo stato sanitario dei vitelli nelle prime settimane di vita sono notevoli. Per quanto l'allevatore possa gestire al meglio la colostratura non può nulla se il colostro è carente in immunoglobuline. Per ovviare al problema si parla di creare banche del colostro aziendali e di somministrarlo solo quando di buona qualità; arrivando anche a consigliare di somministrare 4 L di colostro tramite la sonda esofagea. Si deve tenere però conto che questi "escamotage", che l'uomo ha trovato, non sono accessibili a tutti gli allevatori e si è anche visto che non sono sempre efficaci come si sarebbe sperato; infatti, somministrare grossi volumi di colostro non favorisce l'assorbimento delle immunoglobuline e nemmeno la digestione del vitello.

Sostenendo che la selezione genetica abbia danneggiato la naturale produzione di colostro non vogliamo però far passare un messaggio sbagliato. Non stiamo additando le razze altamente selezionate per la produzione lattea come "negative"; i dati dei nostri vitelli frisoni non sono infatti tali, lo *score* medio di razza è al di sopra del *cutoff* per la sufficienza e l'incidenza di soggetti in FPT è inferiore rispetto ad altri studi. Tuttavia, è innegabile che vi siano numerosi soggetti in FPT e con titoli anticorpali bassi; vogliamo quindi che questo aspetto arrivi a chi si occupa dei programmi di selezione dei bovini.

Sempre più si parla, giustamente, dell'importanza di ridurre il consumo di antibiotici nel campo zootecnico, per rendere possibile questo bisogna puntare su quella che è la prevenzione. Quale strategia preventiva migliore se non proprio il colostro materno, così da crescere vitelli sani e resistenti ai microrganismi patogeni? Sommando la vaccinazione delle bovine in asciutta ad un colostro "di qualità" riteniamo che si possano ottenere risultati eccellenti, tali da permettere una drastica riduzione al ricorso degli antibiotici nelle vitellaie. In quest'ottica pensiamo che una soluzione interessante sarebbe quella di impiegare le razze che hanno dimostrato di essere più efficaci nel trasferimento passivo anticorpale, quali Reggiana e Bianca Modenese, in programmi di incrocio con la Frisona Italiana. È vero che le bovine

nate da questi incroci produrranno quasi certamente meno latte, ma quanto conviene all'allevatore spendere tanto per produrre tanto? Siamo certi che la minor produzione non sia accompagnata invece da un guadagno maggiore, in virtù della forte riduzione dei costi aziendali per terapie mediche e di alimentazione? Non dimentichiamo infatti che sebbene producano meno latte, questo è di maggior qualità e le bovine sono anche molto più longeve, resistenti e sfruttano con efficienza i foraggi verdi. Non è però compito nostro fare valutazioni di ordine economico e tale discorso esula dal nostro studio.

Complessivamente siamo molto soddisfatti dei dati ottenuti e riteniamo che siano degni di essere approfonditi con ulteriori indagini; di seguito avanziamo alcune proposte per studi futuri.

1° Si potrebbero fare analisi quantitative sui titoli anticorpali dei vitelli (ritenute il *gold standard* per questo tipo di analisi), coinvolgendo più razze bovine anche. Il test di precipitazione in sodio solfito, da noi adottato, permette di attribuire solamente degli *score* (0, 1, 2, 3) ed è una metodica semi-quantitativa; anche se, è accurato e molto meno costoso. Con delle metodiche quantitative si possono però ottenere gli esatti titoli sierici anticorpali, potendo quindi confrontare in modo più minuzioso razze simili per attitudine e che, invece, con le metodiche semi-quantitative potrebbero risultare sovrapponibili.

2° Studi di genetica potrebbero individuare nei neonati dei fattori individuali di razza che favoriscano, o meno, l'assorbimento enterico delle immunoglobuline.

3° Infine, pensiamo che le analisi sul colostro sarebbero quelle maggiormente in grado di aiutare a chiarire l'argomento. Studiandone la composizione nelle diverse razze, ma anche la sua produzione quantitativa in rapporto alle curve di lattazione si potrebbero confermare le ipotesi da noi avanzate.

Abbiamo motivo di pensare che i risultati ottenuti con questa ricerca confermino l'ipotesi che ci ha mosso a condurla e si possono prendere ancora diverse strade

per analizzare più a fondo l'argomento. Siamo fiduciosi del fatto che approfondimenti in questo campo possano portare alla luce, in modo chiaro e definitivo, quali siano le influenze che la genetica è in grado di esercitare sui delicati meccanismi alla base del trasferimento passivo colostrale nei vitelli. Non ultimo il fatto che le conoscenze che ne deriverebbero potrebbero essere molto utili, in futuro, per delineare i nuovi piani di selezione dei bovini.

BIBLIOGRAFIA

1. George M. Barrington, Steven M. Parish. *Bovine neonatal immunology*. Novembre 2001, Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.
2. Henri Brugère. Acquisizione della maturità fisiologica. *Il vitello: dalla nascita allo svezzamento*. Milano : Point Veterinaire Italie, 2008, p. 3-10.
3. Alessandro Fantini. Dairy Zoom: Il sistema immunitario del vitello. *Ruminanti.it*. [Online] Aprile 2008. <https://www.ruminantia.it/wp-content/uploads/2016/05/IL-SISTEMA-IMMUNITARIO-DEL-VITELLO.pdf>.
4. Giorgio Poli. *Microbiologia e immunologia veterinaria*. Milano : Edra S.pA, 2017.
5. S. Cavarani, S. Taddei, C.S Cabassi, G. Donofrio, F. Toni, F. Ghidini, C. Piancastelli, E. Schiano, C.F. Flammini. *Deficit di IgG colostrali e di trasferimento di immunità passiva colostrale in allevamenti bovini da latte ad alta produzione*. 3, 2005, Large Animals Review, Vol. 11, p. 17-21.
6. Besser T., Gay C.C. *The importance of colostrum in health of neonatal calf*. 1994, Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, Vol. 10, p. 107-117.
7. Gaetano V. Pelagalli, Luciana Castaldo, Carla Lucini, Marco Patruno, Paola Scocco. *Embriologia: Morfogenesi e Anomalie dello Sviluppo (III° edizione)*. Napoli : Idelson Gnocchi, 2014.
8. K. Stelwagen, E. Carpenter, B. Haigh, A. Hodgkinson and T. T. Wheeler. *Immune components of bovine colostrum and milk*. 2009, Journal of Animal Science.
9. Sandra Godden. *Colostrum Management for Dairy Calves*. 2008, Veterinary Clinics Food Animal Practice, p. 19-39.
10. Sandro Cavarani. Chi ben comincia è a metà dell'opera. Da un vitello sano a una vacca produttiva e longeva. *Professione Veterinaria*. 17-23 Febbraio 2020, p. 8-9.

11. Kamilla Puppel, Marcin Golebiewski, Grzegorz Grodowski, Jan Slosarz, Malgorzata Kunowska-Slosarz, Pawel Solarczyk, Monika Lukasiewicz, Marek Balcerak and Tomasz Przysucha. *Composition and Factors Affecting Quality of Bovine Colostrum: A Review*. 2019, *Animals*.
12. Walter L. Hurley, Peter K. Theil. *Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk*. 2011, *Nutrients*, p. 442-474.
13. Kenneth W Hinchcliff, Stanley Done, Walter Gruenberg Peter Constable. [aut. libro]. *Perinatal Diseases. Veterinary Medicine: a textbook of diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats (11th edition)*. s.l. : Saunders Ltd, 2016, p. 1830-1903.
14. Pascal Lebreton, Catherine Garnier. Parametri correlati ai difetti di trasferimento dell'immunità nel vitello. Relazione fra alimentazione e fattori predisponenti. *Large Animals Review*. Febbraio 2005, p. 5-14.
15. Kamila Puppel, Marcin Golebiewsky, Katarzyna Konopka, Malgorzata Kunowska-Slósarz, Jan Slósarz, Grzegorz Grodkowski, Tomasz Przysucha, Marek Balcerak, Beata Madras-Majewska, Tomasz Sakowski. *Relationship between the Quality of Colostrum and the Formation of Microflora in the Digestive Tract of Calves*. 2020, *Animals*.
16. Angelo Mario Cosseddu, Enrico De Santis, Andrea Serraino. [aut. libro]. *Igiene e tecnologie del latte, del colostro e dei prodotti derivati*. P. Avellini, S. Balzan, S. Bonardi A. Armani e et all. *Igiene e Tecnologie degli Alimenti di Origine Animale*. Milano : Point Veterinaire Italie, 2008, p. 206-207.
17. Alessandri Fantini. Come migliorare la qualità del colostro-Parte I. *Ruminantia*. [Online] 24 Gennaio 2019. <https://www.ruminantia.it/come-migliorare-la-qualita-del-colostro-parte-i/>.
18. Étienne Leiseing. Il vitello in diarrea: il ruolo del veterinario. *Le Point Vétérinaire*. Dicembre 2007.
19. Dusty M. Weaver, Jeff W. Tyler, David C. VanMetre, Douglas E. Hostetler, George M. Barrington. *Passive Trasnfer of Colostral Immunoglobulins in Calves*.

Lake Buena Vista (FL) : s.n., 2000. 15th Annual American College of Veterinary Internal Medicine Forum. p. 569-577.

20. Albert Kerbel GmbH. Istruzioni per l'uso: Rifrattometro per colostro. Buchbach, Germany : s.n.

21. Alessandro Fantini. Come migliorare la qualità del colostro-Parte II. *Ruminantia*. [Online] 26 Febbraio 2019. <https://www.ruminantia.it/come-migliorare-la-qualita-del-colostro-parte-ii/>.

22. Jeff W. Tyler, Dale D. Hancox, Steven M. Parish, Douglas E. Rea, Thomas E. Besser, Sean G. Sandors, Leilian K. Wilson. Evaluation of 3 Assays for Failure of Passive Transfer in Calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. Settembre-Ottobre 1996, p. 304-307.

23. Tyler J.W., Steevens B.J., Hosteler D.E. Colostral IgG concentration in Holstein ad Guernsey cows. *American Journal of Veterinary Research*. 1999, p. 1136-1139.

24. M.A. Guy, T.B. McFadden, D.C. Cockrell, T.E. Besser. Regulation of Colostrum Formation in Beef ad Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. 1994, p. 3002-3007.

25. Edyta Wasowska, Kamilla Puppel. Changes in the content of immunostimulating components of colostrum obtained from dairy cows at different levels of production. *Journal of Science Food and Agriculture*. 31 Marzo 2018, p. 5062-5068.

26. Chiara Spelta. Biosicurezza nella gestione dei vitelli per esprimere al meglio il potenziale dell'azienda. *UOFAA*. 2014.

27. James D. Quigley. Passive Immunity in Newborn Calves. *Advances in Dairy Technology*. 2002, p. 273-292.

28. Tamas Kertesz, Richard Paratte. Una rimonta efficace si basa su un'ottimale gestione del colostro. *Ruminantia*. [Online] 30 Novembre 2020. <https://www.ruminantia.it/una-rimonta-efficace-si-basa-su-unottimale-gestione-del-colostro/>.

29. Adriano DelFabbro. Vitello, curare colostratura e svezzamento. *Informatore Zootecnico*. [Online] 22 Marzo 2017.

<https://informatorezootecnico.edagricole.it/bovini-da-latte/vitello-curare-colostratura-svezzamento/>.

30. J. W. G. Porter. Digestion in the pre-ruminant animal. *cambridge.org*. [Online] <https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/S0029665169000255>.

31. Alessandro Fantini. L'importanza di una corretta alimentazione della vitella. *Ruminantia*. [Online] 2013. <https://www.ruminantia.it/wp-content/uploads/2016/05/LIIMPORTANZA-DI-UNA-CORRETTA-ALIMENTAZIONE-DELLA-VITELLA.pdf>.

32. Il vitello e l'alimentazione pre-ruminante. *studionutrizioneanimale.it*. [Online] 11 Agosto 2019. <http://www.studionutrizioneanimale.it/2019/08/11/vitello-alimentazione-pre-ruminante/>.

33. T. E. Staley, L. J. Bush. *Receptor Mechanism of the Neonatal Intestine and Their Relationship*. 1985, Journal of Dairy Science, p. 184-205.

34. L.J. Bush, T. E. Staley. *Absorption of Colostral Immunoglobulins in Newborn Calves*. 1980, Journal of Dairy Science, p. 672-680.

35. Sheila M. McGuirk. *Colostrum: Quality and Quantity*. St. Paul : s.n., 1992. XVII Word Buiatrics Congress. p. 162-167.

36. Zootecnia: Atlante razze bovine taurine e zebuine. *Agraria.org*. [Online] <https://www.agraria.org/zootecnia.htm>.

37. Elaine Hunt, Kevin L. Anderson. Diagnosis of Colostrum Deprivation in Calves. *The Bovine Proceedings*. Aprile 1988, p. 108-111.

38. M. Colombo. Le Diagnosi Differenziali nelle Enteriti Neonatali del Vitello. *Large Animal Review*. Ottobre 2006, p. 37-40.

39. Yves Millemann. Gli agenti enteropatogeni del vitello. *Le Point Vétérinaire*. Dicembre 2007.

40. F. M. Hopkins, D. F. Dean, W. Greene. *Failure of Passive Transfer in Calves: Comparison of Field Diagnosis Methods*. 1984, *Modern Veterinary Practice*, p. 625-628.
41. El Cuttance, C. Regnerus, RA Laven. *A review of diagnostic tests for diagnosing failure of transfer of passive immunity in dairy calves in New Zealand*. 2019, *New Zealand Veterinary Journal*.
42. Treccani. *Treccani.it*. [Online] <https://www.treccani.it/vocabolario/razza/>.
43. Salvatore Mastrangelo et al. *Conservation status and historical relatedness of Italian cattle breeds*. 2018, *Genetics Selection Evolution*.
44. P. Mariani, A. Summer, P. Formaggioni, M. Malacarne. *La qualità casearia del latte di differenti razze bovine*. 2002, *La Razza Bruna*, p. 7-13.
45. ANAFI.it. [Online] <http://www.anafi.it>.
46. razzareggiana.it. [Online] <https://www.razzareggiana.it>.
47. La razza Bianca Modenese. *consorziobiancamodenese.it*. [Online] <http://www.consorziobiancamodenese.it/razza.html>.
48. ANABORAPI. [Online] <https://www.anaborapi.it>.
49. Ugo Vaccaneo. *"Fassona" piemontese, orgoglio italiano*. 2021, *Allevatori top*, p. 56-62.
50. Fabiola Canavesi. Genomica e diversità genetica. *Allevatori Top*. Marzo 2021, p. 40-45.
51. Alessandro Fantini. Il bilancio proteico nella bovina da latte: tra fertilità e mastite. *SUMMA animali da reddito*. Marzo 2017, p. 19-28.