

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali

Corso di Dottorato di Ricerca in

Scienze delle produzioni vegetale ed animali
XXX Ciclo

Marcatori del latte per lo studio delle infiammazioni intramammarie nella bovina da latte (AGR/19)



Tesi di dottorato di:

Dott.ssa Federica Signorelli
.....

Coordinatore del corso

Prof.ssa Stefania Masci
.....

Tutore

Prof. Nicola Lacetera
.....

Co-tutore

Dott.ssa Cinzia Marchitelli
.....

INDICE

ABSTRACT

RIASSUNTO

1 INTRODUZIONE

1.1 Problematiche sanitarie e di benessere della vacche da latte

1.2 La Frisona

1.3 Sistema immunitario

1.4 Ghiandola mammaria e immunità

1.4.1 La difesa strutturale della ghiandola mammaria

1.4.2 Immunità innata e acquisita

1.4.3 Geni ed immunità

1.5 Latte

1.5.1 Il lattosio

1.5.2 I lipidi

1.5.3 Le proteine

1.5.4 Componenti minori

1.5.5 La spettroscopia del medio infrarosso (MIR): un metodo high throughput

1.5.6 Fattori che influenzano la qualità del latte

1.5.7 Parametri tradizionali per valutare lo stato di salute

1.5.8 Il glicoma: un potenziale strumento di monitoraggio della salute animale

1.6 Scopo della tesi

2 MATERIALI E METODI

2.1 Animali

2.2 Campionamento

2.3 Esperimento 1

2.3.1 Analisi MIR

2.3.2 Analisi del profilo dell’N-glicosilazione dell’immunoglobulina G

2.3.3 Analisi statistica

2.4 Esperimento 2

2.4.1 Analisi dei metaboliti

2.4.2 Analisi d’espressione dei geni IL-8, SELL e GSN

2.4.3 Analisi statistica

3 RISULTATI

3.1 Esperimento 1

3.2 Esperimento 2

4 DISCUSSIONE

4.1 Esperimento 1

4.1.1 Minerali

4.1.2 Profilo acido

4.1.3 Acidi grassi dispari e ramificati

4.1.4 Acidi grassi e infiammazione

4.2 Esperimento 2

4.2.1 Grasso

4.2.2 Lattosio

4.2.3 Isocitrato

4.2.4 Glucosio e glucosio-6-fosfato

4.2.5 BHB

4.2.6 Urea

4.2.7 Acido urico

4.2.8 NAGasi e LDH

4.2.9 Espressione dei geni dell'IL-8, SELL e GSN

5 CONCLUSIONI

6 BIBLIOGRAFIA

ABSTRACT

For several decades, breeding goals in dairy cattle focused on increased milk production. Herd management has been challenged to compensate and to balance fertility, udder health and metabolic diseases against increased production to maximize profit without compromising welfare. Functional traits, such as direct information on cow health, have also become more important because of growing concern about animal well-being and consumer demands for healthy and natural products. There are major concerns about the impact of drugs used in veterinary medicine on the spread of antibiotic-resistant strains of bacteria that can negatively impact human health. Sustainability and efficiency are also increasingly important because of the growing competition for high-quality.

During transition period dairy cattle undergo physiological changes (i.e. hormonal and immune dysregulation) due to the lactation onset, that easily lead to an increase of metabolic and infectious diseases. Consequently, in this period dairy cows are most susceptible to developing common peripartum diseases (retained placenta, metritis, endometritis, ketosis, displaced abomasum, mastitis, lameness, Johne's disease, leukosis, salmonellosis, abortion). Approximately 75% of disease in dairy cows typically happens in the first month after calving. It is difficult to overstate the crucial role of the transition period in dairy cow health and performance throughout lactation.

The general aim of this study is, firstly, to study association of some traditional and some innovative phenotypical features of bovine milk with somatic cell count (SCC) and then, to exploit them, for assessing the health status of mammary gland. In particular, the main purpose of this research was the identification of potential and sensitive milk biomarkers to promote an early detection and consequently mastitis prevention, by providing to breeders new tools for an efficient management and an optimal production efficiency.

Depending on different degrees of intensities, the intramammary inflammation (IMI) leads to immunological and pathological changes in the mammary tissue and to a wide range of consequences regarding physical, chemical, and often microbiological alterations of secreted milk.

This study was carried out on Holstein cows, reared at an experimental farm and divided into two parallel trials. In the first one, a herd of 45 cows was monitored in the three weeks postpartum. Milk samples were collected to analyse traditional parameters, as fatty acid profile, mineral component and some metabolites (acetone, citrates and β -hydroxybutyrate (BHBA)) by a predictive and high throughput technology, Fourier transform mid-infrared (FT-MIR) spectrometry, and an innovative parameter, glycans on the IgG fraction of milk, by ULPC (ultra-high pressure liquid chromatography). In the second trial milk metabolic parameters (BHBA, isocitrate, urea, uric acid, glucose-6-phosphate and free glucose), conventional inflammatory biomarkers (SCC, lactate dehydrogenase (LDH), N-acetyl- β -d-glucosaminidase (NAGase)) were quantified and IL8, L selectin and gelsolin gene expression were measured in somatic cells. This second trial was carried out on samples relative to only 17 out of the 45 cows. At the early inflammatory response, vascular system expresses several proinflammatory cytokines (i.e. IL8) and various adhesion molecules (i.e. L-selectin), to facilitate the migration of leukocytes from the blood to the site of injury. Gelsolin is an actin binding protein, remodelling actin cytoskeleton and controlling cell morphology, migration, invasion, and movement of the cell membrane, as phagocytosis.

In the first experiment milk samples were classified into 3 groups, based on SCC. Canonical discriminant analysis showed that two fatty acids (palmitic and α linoleic acid), $\omega 6$ and two minerals (sodium and potassium) could be considered as indicator of IMI. By FT-MIR spectrometry, which allows fast and non-destructive predictions of milk composition, these parameters could be online analysed consenting breeders to monitor health status and to take action in real time.

Finally in the second experiment it was highlighted as gelsolin expression could be a good predictor of mammary gland health status and of ongoing inflammation, being correlated with LDH, NAGase and SCC. The next step should be allele-phenotype association studies, especially genome-wide association studies (GWAS), to search for such potential common defence mechanisms (innate immunity) and different genetic mechanisms (gene polymorphisms) existing in dairy cows which alter their responses to invading pathogens within the mammary gland.

In the future, ways to reduce inflammation while maintaining a good immune defence must be developed and ideally, cows with a lower susceptibility to both diseases and inflammation be selected.

RIASSUNTO

Il raggiungimento di alti livelli di produzione in zootecnia ha determinato una maggiore difficoltà degli animali ad adattarsi all'ambiente. Questo si è tradotto in un aumento dei tassi di rimonta, una minore longevità, una maggiore frequenza di malattie variegata e multifattoriale, con un conseguente maggior uso di farmaci veterinari. Nel caso delle bovine da latte l'insorgenza di malattie condizionate è facilitata dalla presenza di fenotipi animali ad alta produzione che richiedono elevate competenze tecniche e gestionali, strutture adeguate e controlli intensivi dell'allevatore, in rapporto ad una ridotta capacità di adattamento a condizioni sub-ottimali dell'ambiente.

Nel periodo di transizione si verificano importanti cambiamenti fisiologici, metabolici, immunologici e nutrizionali che mostrano un legame con l'eventuale sviluppo di patologie cliniche e subcliniche nel post-parto e un effetto di lunga durata sulle performances produttive e riproduttive dell'intera lattazione. Il rischio è elevato tanto per le forme tipiche del periparto (ritenzione di placenta, collasso puerperale, acetonemia o chetosi primaria, steatosi epatica, metrite, dislocazione abomasale), quanto per le altre affezioni (mastiti, zoppie, turbe intestinali, virosi ecc.). Si stima che il 75% delle affezioni metaboliche e infettive delle bovine da latte si verifichi nel primo mese di lattazione e che il 50% delle lattazioni sia associato ad almeno una dismetabolia nel periparto. Nel periodo di transizione dunque, la maggior parte delle bovine è facilmente colpita da affezioni e ne deriva quindi che la prevenzione delle affezioni è la strada per il successo dell'intera lattazione e della carriera produttiva della lattifera.

Lo scopo generale della presente tesi è stato quello di studiare le associazioni tra alcune caratteristiche fenotipiche del latte, sia di tipo tradizionale sia di tipo innovativo, con la conta delle cellule somatiche del latte, per stimare la possibilità di utilizzare questi parametri per valutare lo stato di salute della ghiandola mammaria. Più in particolare, il fine ultimo della presente ricerca è stato l'identificazione di potenziali biomarkers, che possano promuovere la diagnosi precoce e quindi la prevenzione di patologie, fornendo agli allevatori nuovi strumenti per una gestione efficiente e per una migliore produttività.

L'infiammazione intramammaria (IMI), accompagnata da cambiamenti immunologici e patologici nel tessuto mammario, può sviluppare infatti una vasta gamma di conseguenze sulla qualità fisica, chimica e spesso microbiologica del latte.

Lo studio è stato effettuato su vacche Frisone allevate presso un'azienda sperimentale ed è consistito in due esperimenti paralleli. Nella prima prova è stata considerata l'intera mandria di 45 vacche e sono stati analizzati parametri tradizionali, come il profilo acido, il contenuto dei minerali e alcuni metaboliti (acetone, citrati e β -idrossibutirrato (BHB)) con un metodo predittivo e high throughput (la spettroscopia del medio infrarosso: MIR) e parametri innovativi quali il profilo della N-glicosilazione dell'immunoglobulina G con la ultra cromatografia liquida ad alte prestazioni. Nella seconda prova sono stati determinati, su 17 bovine della stessa mandria, alcuni parametri tradizionalmente studiati nel latte (BHB, isocitrato, urea, glucosio-6-fosfato, glucosio, conta delle cellule somatiche (SCC), L-lattato deidrogenasi e NAGasi) e l'espressione genica nelle cellule somatiche del gene dell'IL-8, della L-selectina e della gelsolina, tutti geni coinvolti nella risposta immunitaria dell'ospite. Durante le prime fasi dell'infiammazione, il sistema vascolare esprime diverse citochine proinfiammatorie chemiotattiche, tra cui l'IL-8, e diverse molecole di adesione, come L-selectina, che promuovono l'aderenza dei leucociti e il reclutamento di citochine aggiuntive nei tessuti sottostanti. La gelsolina è un actin binding protein, che, rimodellando l'actina del citoscheletro, regola la migrazione cellulare e i movimenti della membrana cellulare, come la fagocitosi.

Nel primo esperimento l'analisi multivariata dei parametri misurati nei campioni di latte, suddivisi in tre gruppi in base alla SCC, ha evidenziato che due acidi (C16:0 e C18:2 c9c12), gli ω 6 e due minerali (sodio e potassio) possono essere considerati come indicatori di IMI. Tramite la tecnica MIR, tali parametri sono rapidi da identificare ed, in futuro, quindi applicabili anche online nelle sale di mungitura, permettendo agli allevatori di monitorare lo stato di salute degli animali e di intervenire in tempo reale.

Il secondo esperimento ha mostrato come l'espressione della gelsolina possa essere un buon predittore dei cambiamenti delle concentrazioni di LDH, NAGasi, grasso e della conta somatica cellulare nel latte, quindi un buon indicatore dello stato di salute della mammella e della presenza di infiammazioni in corso. Il passo successivo dovrebbe essere uno studio di associazione (fenotipi - alleli) come la GWAS per ricercare i meccanismi di difesa e i polimorfismi genici che possano alterare la risposta dell'animale.

In futuro sarà necessario sempre più ridurre le infiammazioni, conservando una buona difesa immunitaria per selezionare animali meno suscettibili sia alle malattie che alla risposta infiammatoria.

1 INTRODUZIONE

1.1 Problematiche sanitarie e benessere delle bovine da latte

Negli ultimi 50 anni la produzione di latte bovino ha fatto registrare una continua e radicale evoluzione verso sistemi di allevamento di tipo intensivo. Tale evoluzione ha prodotto un incremento costante dell'efficienza delle produzioni che in molti casi ha però comportato una diminuzione della qualità dei prodotti e un peggioramento del benessere animale. Peraltro, tali sistemi non sono stati sempre in grado di migliorare la competitività delle aziende dal punto di vista economico.

Mantenere le vacche lattifere in buono stato di salute riveste un ruolo cruciale per poter puntare ad avere performance produttive e riproduttive soddisfacenti per incrementare la longevità degli animali. La riduzione delle condizioni di benessere degli animali allevati, accompagnata da un aumento dell'incidenza di alcune patologie, è stato uno dei fattori che ha determinato negli anni un incremento significativo dell'uso di farmaci, soprattutto di antibiotici. Pur considerando i molteplici benefici derivanti dall'uso di tali farmaci nel controllo delle malattie all'interno dell'allevamento, è bene evidenziare tuttavia come i residui di antibiotici possano entrare nella catena alimentare umana, aumentando il rischio di effetti allergici e contribuendo alla selezione di batteri farmacoresistenti.

L'opinione pubblica, le disposizioni legislative e regolamentari della Comunità Europea hanno poi sottolineato il fondamento del benessere animale e della prevenzione delle malattie, indirizzando la maggior parte delle industrie del settore e delle organizzazioni pubbliche e private di allevatori verso l'adozione di politiche e di programmi in grado di garantire il benessere e la salute animale e la qualità dei prodotti ai consumatori, applicando varie restrizioni nelle procedure di allevamento e di management.

Il 15 marzo 2016 la Commissione Europea (Eurobarometro 2016) ha pubblicato un'indagine sulla percezione del benessere degli animali condotta presso i cittadini Europei.

- Il 94% dei cittadini pensa che proteggere il benessere degli animali d'allevamento sia importante.
- L'82% pensa che gli animali dovrebbero essere tutelati meglio di quanto non lo siano ora.
- Il 64% degli intervistati vorrebbe avere più informazioni sul trattamento degli animali di allevamento nel loro paese.
- L'89% crede che la legislazione europea dovrebbe obbligare le persone ad avere cura degli animali usati per fini commerciali.

- Metà dei cittadini dell'Unione Europea guarda le etichette per identificare prodotti con più alti standard di benessere animale ed il 59% è disposto a pagare di più per prodotti migliori.

La definizione di benessere della bovina da latte presenta aspetti complessi, infatti si rischia l'antropomorfizzazione, ossia di considerare l'etologia di questi animali come se fosse simile a quella dell'uomo,

Un allevamento che rispetti il diritto delle bovine ad esprimere al meglio il loro naturale comportamento deve presupporre una perfetta conoscenza della loro etologia, condizione che porterebbe anche a ottenere le migliori prestazioni produttive, riproduttive e sanitarie. Un concetto fondamentale è che il benessere oltre ad essere un fattore etico è anche un requisito della produzione. Un animale che soffre sia fisicamente sia psicologicamente non sarà pienamente produttivo e soprattutto avrà una fertilità, una salute e una longevità non ottimali.

Si parla ormai di qualità etica che aggiunge valore ai prodotti alimentari di origine animale.

Il giusto scopo da perseguire è la riqualificazione della produzione di latte bovino verso quanto richiede il consumatore, come si evince anche da progetti privati finalizzati a fornire un aiuto concreto a difesa dei diritti degli animali allevati, dell'ambiente, della salute delle persone, dell'agricoltura e dell'industria agro-alimentare.

Sicuramente il maggior progresso raggiunto nello studio sulla salute delle vacche da latte è stato quello di comprendere la natura multifattoriale di quasi tutte le malattie importanti che colpiscono le bovine. Uno strumento funzionale per descrivere e quantificare l'interconnessione dei fattori di rischio è stato lo studio epidemiologico diffuso nei varie Paesi in questi ultimi anni. A loro volta il management sanitario e la medicina veterinaria sono stati caratterizzati da un approccio multidisciplinare definito come promozione di salute, miglioramento di produttività e prevenzione delle malattie in un contesto di redditività economica e di sostenibilità ambientale.



Figura 1. Ciclo del management sanitario: il monitoraggio e il miglioramento si interfacciano continuamente (Leblanc et al., 2006).

E' stato anche necessario ridefinire il concetto di malattia in senso più ampio, includendo anche condizioni subcliniche e tutti quei fattori che possano limitare le performance sia del singolo animale sia dell'intera mandria. Si può illustrare il management sanitario come un ciclo dove il monitoraggio e il miglioramento si interfacciano continuamente (Fig 1).

L'equilibrio tra malattia e salute, rappresentato schematicamente in Fig 2, e più propriamente il bilancio tra fattori di rischio e fattori protettivi, che determinano lo stato di salute, dipende dall'interazione tra i componenti della triade epidemiologica: ospite, agente patogeno e ambiente, tutti e tre influenzati direttamente dalle pratiche di management (Leblanc et al., 2006).

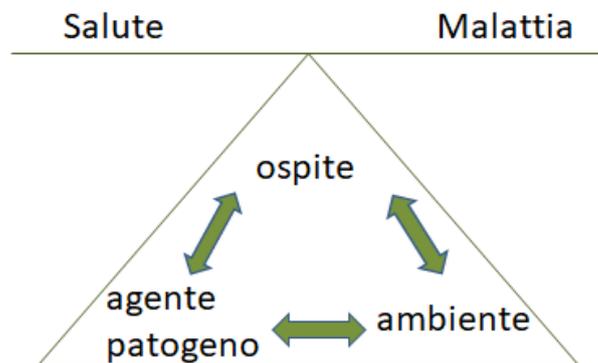


Figura 2. Stato di equilibrio tra salute e malattia (Leblanc et al., 2006).

A titolo esemplificativo, spesso lo spazio di cui dispongono le vacche è molto ristretto determinando un peggioramento delle condizioni igieniche complessive della stalla che insieme allo stress indotto dalla densità elevata può determinare un aumento del rischio di infezioni (Hultgren et al., 1998).

Gli strumenti che ci fornisce l'epidemiologia sono fondamentali per dimostrare e quantificare l'interconnessione tra le più comuni patologie della vacca da latte, quali ritenzione della placenta, chetosi, zoppie, salmonellosi, endometriti, infiammazioni mammarie e leucosi.

Circa il 75% delle malattie nelle bovine si manifesta nel primo mese post partum (LeBlanc, 2006). Queste problematiche sono radicate nelle funzioni immunitarie come anche nell'alimentazione nelle 2-3 settimane prima del parto. E' ormai riconosciuto il ruolo cruciale del periodo di transizione, in quanto i disturbi fisiologici che avvengono in tale periodo mostrano un effetto a lunga durata sullo stato di salute e sulle performances produttive e riproduttive dell'intera lattazione (Pinedo et al. 2010).

Le malattie metaboliche e le infezioni tendono a essere spesso associate, perché ogni singolo evento infiammatorio aumenta la possibilità che se ne presentino altri a cascata. Per esempio le vacche in chetosi sviluppano la mastite con una frequenza doppia rispetto a quelle sane, oppure vacche con ritenzione di placenta facilmente mostrano un'alta incidenza di mastiti (Sordillo and Raphael, 2013; Sordillo, 2016).

I costi di una fase di transizione problematica che si associ a una compromissione dello stato sanitario della mammella sono ingenti, ma non sempre è facile stimarne l'entità. Il primo costo riguarda l'uso di farmaci e la conseguente eliminazione di latte a causa della contaminazione con

principi attivi. Un secondo riguarda la mancata produzione che si verifica quando le bovine sono affette da una qualsiasi affezione. Tale perdita non è sempre evidente nel primo mese di lattazione, specie in bovine ad alta potenzialità produttiva, in quanto, almeno in parte, viene colmata dal maggior ricorso alle riserve corporee. E' opportuno ricordare che la riduzione di un kg/die di latte al picco di produzione comporta la perdita di circa 200 kg sui canonici 305 giorni di lattazione. Un terzo costo, ancor più difficile da quantificare, riguarda le conseguenze negative a carico della qualità del latte, essenzialmente per la riduzione della resa casearia (titolo lipidico e proteico), del tenore caseinico e del peggioramento delle prerogative casearie (attitudine alla coagulazione e acidità titolabile); tutti aspetti che hanno un riflesso negativo sul pagamento del latte a qualità. Un quarto rilevante costo riguarda l'aumentata frequenza delle affezioni nei soggetti che hanno già manifestato una transizione problematica, nonché del peggioramento delle performance riproduttive (Bertoni et al., 2008) e della longevità. Infine non va trascurato il costo del personale dedito all'assistenza e l'inevitabile complicazione della routine aziendale.

Molte review sono state dedicate ai notevoli cambiamenti dell'efficienza del sistema immunitario (Bertoni et al., 2015; Sordillo et al., 2009; Sordillo, 2016; van Kneegsel et al., 2014; Aleri et al., 2016; Ingvarstsen and Moyes, 2013; LeBlanc, 2010). I cambiamenti avvengono sia per la risposta immunitaria innata sia per quella adattativa, e possono inficiare la resistenza nei confronti delle malattie, nonché la severità dell'evento allorquando l'infezione si manifesti. La disfunzione delle reazioni infiammatorie avviene a livello sistemico e locale avendo quindi un impatto diretto con la patogenesi della malattia. Tali squilibri nella risposta infiammatoria possono manifestarsi in uno stato iporeattivo, caratterizzato da una migrazione ritardata dei neutrofili e/o da una loro alterata efficienza di fagocitosi, come anche di altri fattori immunitari, nello stato iniziale della patologia in atto (Sordillo, 2016). E' stato inoltre evidenziato che vacche, che mostrano una ridotta capacità dei neutrofili di subire la chemiotassi e di produrre le specie reattive dell'ossigeno (ROS), ad inizio lattazione, sviluppano più facilmente mastiti e metriti (Cai et al, 1994). Viceversa la mancanza di un adeguato bilanciamento tra l'inizio e la risoluzione dell'infiammazione può risultare in una risposta eccessivamente vigorosa o addirittura cronica, con il conseguente danneggiamento tissutale dell'ospite. Vari studi mostrano come, ad inizio lattazione, la capacità della ghiandola mammaria di reagire all'endotossina dell'*E.coli* sia inferiore rispetto a quella di metà lattazione (Grommers et al., 1989). Anche la rallentata migrazione neutrofila e la conseguente ridotta capacità antimicrobica si pensa siano la causa di numerosi mastiti coliformi, sempre ad inizio lattazione, più frequenti che a fine lattazione (Shuster et al., 1996).

Le cause sottese a un'anomala infiammazione durante il periodo di transizione mostrano almeno in parte un'interazione bidirezionale tra il sistema endocrino e quello immunitario: le popolazioni

immunitarie cellulari non solo esprimono recettori ormonali ma anche mostrano capacità di produrre vari fattori neuroendocrini (Lamote et al., 2006; Weigent, 2013). Vari lavori hanno mostrato come i recettori per i glucocorticoidi e l'aumento della concentrazione di tali ormoni nel sangue nel periparto abbiano un effetto immunosoppressivo (Lippolis et al., 2006; Kelley et al., 2007).

Per esempio è stato dimostrato il meccanismo attraverso il quale i glucocorticoidi possono alterare negativamente le funzioni dei neutrofili inducendo una downregulation sia del CD18 che della L-selectina, ossia di molecole di adesione necessarie all'attivazione e alla migrazione verso i siti di infezione (Burton et al., 1995).

Cambiamenti nell'espressione di ormoni vicino al parto e all'inizio della lattazione possono effettivamente influenzare le funzioni delle cellule immunitarie nelle vacche durante il periodo di transizione.

Anche i cambiamenti fisiologici e metabolici associati al parto e alla lattogenesi sono implicati nel sconvolgimento della risposta immunitaria e infiammatoria (Sordillo and Raphael, 2013; van Knegsel et al., 2014).

Kimura et al. (1999) e Nonnecke et al. (2003) hanno effettuato ricerche su vacche mastectomizzate, osservando come le funzioni dei linfociti e neutrofili sono più a lungo alterate rispetto a quelle con ghiandola mammaria sana. Sono quindi giunti alla conclusione che il parto non svolge l'azione soppressiva principale, ma che invece, l'aumentata richiesta metabolica all'inizio sembra essere la responsabile delle condizioni avverse in cui si trovano le popolazioni cellulari dell'immunità.

Molteplici ricerche incentrate sulla fisiologia della vacca ad alta-produzione hanno evidenziato come la prevenzione per le malattie debba smantellare la compartimentalizzazione tra la medicina veterinaria, la scienza zootecnica e gli aspetti nutrizionali. A titolo di esempio, molti studi svolti sul feed intake e l'adattamento metabolico al bilancio energetico negativo post partum sono relazionati allo sviluppo e agli effetti del fegato grasso, e hanno permesso di migliorare la comprensione della patofisiologia della chetosi e della dislocazione dell'abomaso. Per limitare lo sviluppo della mastite negli allevamenti invece si è concertato lo sviluppo di buone pratiche di post-milking, come la disinfezione dei capezzoli e l'igiene nelle sale di mungitura, e di attenzioni del periodo di asciutta come l'applicazione di antibiotici ad azione prolungata e di un'alimentazione idonea.

Un aiuto ulteriore è fornito da progetti internazionali per la costituzione e la condivisione di veri e propri database, non più solo a livello nazionale gestito da associazioni locali di allevatori, che raccogliendo migliaia di dati sul management aziendale, possano dare un valido e concreto contributo alla diagnosi precoce delle patologie bovine e agli sforzi volti alla prevenzione tramite un adattamento sistematico alle necessità delle mandrie.

Questo indispensabile scambio di informazioni e di approcci differenti è in continua evoluzione: aiuta e aiuterà sempre più ad avere non più una prospettiva limitata e ristretta ma una visione completa, per meglio dire olistica dell'animale.

1.2 La Frisona

La razza bovina da latte più diffusa al mondo è la Frisona.

Attualmente essa presenta un potenziale produttivo pari o superiore a 10.000 kg di latte/lattazione e tassi di rimonta elevati (>30%) che dipendono in buona misura da una compromissione dello stato sanitario che interviene spesso proprio durante il periodo di transizione. Nelle aziende del nord-est degli USA, le bovine vive a 48 mesi di vita sono passate dall' 80% nel 1957 al 13% nel 2002 con un intervallo interparto medio salito da 13 a 15,5 mesi (Oltenacu and Broom, 2010). Va tuttavia sottolineato che i meccanismi biologici sottostanti a tali fenomeni sono solo in parte noti (Oltenacu and Broom, 2010). Tale tendenza generale è riscontrabile da tempo anche in Italia. Nel 2010 è stata registrata una produzione media di 9.075 kg, con contenuto medio pari a 3.64% e 3.31%, rispettivamente per grasso e proteina, su 651.489 lattazioni (dati ANAFI, Associazione Nazionale Allevatori di Frisona Italiana). Questi dati dimostrano un netto miglioramento quantitativo e qualitativo della produzione e devono essere opportunamente compresi e interpretati alla luce di altri fenomeni. In effetti, l'analisi comparativa di aziende a diverso profilo produttivo e stato sanitario dimostra che l'aumento della produzione di latte ottenuta per selezione genetica non è di per sé causa di riduzione del benessere e della sanità animale, bensì un fattore cui una parte della popolazione animale non è in grado di rispondere con strategie di adattamento adeguate, specie quando sono presenti deficit strutturali di stabulazione e conduzione aziendale. Tali deficit sono purtroppo ancora diffusi nei nostri allevamenti. Uno studio di campo condotto su 231 aziende delle provincie di Milano, Lodi, Pavia, Cremona (Relazione finale progetto di ricerca MINSAL 01/03 "Standardizzazione e verifica sperimentale dei parametri clinici, comportamentali e laboratoristici di benessere nei bovini da carne e da latte") aveva infatti rilevato importanti deficit strutturali in molte aziende relativi in particolare alla abbeverata delle bovine nella prime fasi di lattazione, allo spazio a disposizione su lettiera permanente delle bovine in asciutta, allo spazio a disposizione nella sala di attesa per la mungitura. Sebbene vi sia la tendenza al miglioramento strutturale degli allevamenti, i problemi evidenziati alcuni anni fa, purtroppo, persistono, anche per le ricorrenti dinamiche di compressione del prezzo del latte che rallentano gli investimenti. Per tale motivo, un divario evidente può sorgere tra le esigenze delle bovine da latte ad alta produzione e ambiente in cui queste vengono allevate. Questa fondamentale condizione di rischio può coesistere con elevati livelli di prestazioni produttive. Queste sono compromesse da malattie clinicamente conclamate e/o

gravi disfunzioni metaboliche; entrambi i casi portano allo stesso risultato: rimozione precoce degli animali dal processo produttivo e aumento complessivo dei tassi di rimonta (Amadori, 2015).

Le riflessioni fatte sul miglioramento genetico per le aziende che optavano per una produzione biologica da numerosi studi internazionali, hanno evidenziato la necessità di spostare il focus della selezione dalla quantità della produzione alla resistenza alle malattie, alla longevità, alla fertilità, alla funzionalità e alla robustezza, abbinate alla qualità delle produzioni. E' ormai nota e largamente condivisa tra gli addetti ai lavori la necessità di definire indici di selezione specifici e diversi rispetto a quelli di selezione tradizionali (Amadori, 2015).

In Italia tutto questo si può ottenere scegliendo di allevare razze locali che già presentano le seguenti caratteristiche, ma anche continuando ad allevare razze cosmopolite come la Frisona o la Bruna, utilizzando però, strumenti di selezione che abbiano come obiettivo più qualità e funzionalità rispetto agli indici di selezione ufficiali che determinano le classifiche dei tori e delle vacche come PFT (indice di selezione genetica: produzione, funzionalità, tipo) e ITE (indice economico totale). Indici cioè che diano ai caratteri produttivi un'importanza inferiore al 40%, e almeno il 50% di rilevanza a tutti gli aspetti funzionali che includono fra gli altri fertilità, longevità, facilità al parto, resistenza alle patologie. Per la Frisona Italiana, dall'agosto 2016, l'Indice Economico Salute (IES) è sia lo strumento che permette di fare scelte che indirizzano il miglioramento genetico in questa direzione sia quello che consente di fare valutazioni di tipo economico sulla redditività delle bovine figlie dei diversi riproduttori. In Tabella 1 si mette a confronto la ripartizione fra caratteri produttivi, aspetti morfologici e funzionali dell'indice di selezione nazionale, PFT, e dello IES per la Frisona Italiana. È evidente come questo nuovo indice sposti l'enfasi dalla produzione alla funzionalità. Sono inclusi caratteri come il BCS, indicatore indiretto di una maggiore efficienza alimentare e robustezza generale degli animali, e la facilità al parto delle figlie che non sono considerate nella formulazione del PFT. Fertilità, longevità e salute hanno un peso preponderante in questo nuovo indice ancora sottoutilizzato dai più.

Tabella 1 – La composizione in percentuale dell'indice di selezione ufficiale (PFT) e dell'Indice Economico Salute (IES) per la Frisona Italiana.

Componente	PFT	IES
Produzione	49	39
Morfologia	23	10
Funzionalità	28	51

1.3 Sistema immunitario

Un sistema immunitario funzionante deve proteggere le bovine da latte da una varietà di organismi patogeni che comprendono virus, batteri e parassiti. Per adempiere a questo compito, il sistema immunitario utilizza un network complesso e dinamico di tessuti, cellule e molecole.

1.4 Ghiandola mammaria e immunità

Una comprensione completa dell'immunità della ghiandola mammaria (MG), sia in condizioni sane sia infiammatorie, costituisce una chiave fondamentale per comprendere la natura delle infezioni intramammarie (IMI) causate da specifici agenti patogeni e può contribuire in modo determinante allo sviluppo di metodi di controllo efficaci e di tecniche di rilevamento appropriate.

L'infiammazione intramammaria è accompagnata da cambiamenti immunologici e patologici nel tessuto mammario, può avvenire a differenti gradi di intensità e può sviluppare una vasta gamma di conseguenze sulla qualità fisica, chimica e spesso microbiologica del latte.

Nella maggior parte dei casi l'infezione della mammella avviene attraverso l'ascensione nel ductus papillaris, l'unica apertura della mammella verso l'esterno (Zecconi et al., 2002), dove poi gli agenti patogeni trovano un ambiente caldo, umido e pieno di nutrienti, idoneo perciò ad una loro rapida crescita e moltiplicazione. Affinché l'infezione abbia successo i batteri devono combattere le attività antimicrobiche del capezzolo e dell'ambiente interno (Sordillo and Streicher, 2002). Delle adeguate risposte immunitarie sono essenziali per la difesa dell'ospite contro le IMI. L'immunità dipende dalla combinazione complessa e dal coordinamento di elementi protettivi aspecifici e specifici, tra cui le caratteristiche anatomiche della ghiandola come anche dai componenti difensivi cellulare e umorali (Sordillo et al., 1997). Tuttavia è bene sottolineare come la difesa immunitaria della mammella vari in funzione dello stadio di lattazione della bovina e sia tipicamente alterata dall'esposizione allo stress al momento del parto e nel periodo di asciutta.

1.4.1 La difesa strutturale della ghiandola mammaria

Il meccanismo di difesa primario della MG è rappresentato dal canale del capezzolo (Zecconi et al., 2002; Nickerson, 1985; Paulrud, 2005), che agisce sia come barriera fisica sia come fonte di sostanze antimicrobiche. La barriera fisica è fornita dallo sfintere che circonda il canale, che impedisce contemporaneamente la fuoriuscita del latte e l'ingresso dei diversi agenti patogeni mantenendo una chiusura stretta (Zecconi et al., 2002; Sudhan and Sharma, 2010; Paulrud, 2005).

La difesa antimicrobica è più complessa e comprende parecchi componenti. La pelle di un capezzolo sano è rivestita normalmente da un mantello protettivo di acidi grassi (FA) che rallentano la crescita di batteri patogeni (Zecconi et al., 2002). Inoltre, l'epitelio squamoso del dotto produce cheratina, un materiale ceroso che riveste il canale, in grado di bloccare i batteri invasori e di ostacolare la migrazione di microrganismi nella cisterna ghiandolare. La cheratina contiene anche agenti antimicrobici che aiutano nella lotta contro l'infezione (Paulrud, 2005) ed è composta da acidi grassi esterificati e non, con proprietà batteriostatiche, come l'acido laurico, miristico, palmitoleico e linolenico, e da proteine fibrose, che si legano elettrostaticamente ai microrganismi, alterandone quindi la parete cellulare e rendendola più suscettibile ai cambiamenti della pressione osmotica e perciò conducendoli prima alla lisi e poi all'apoptosi (Paulrud, 2005). Il contenuto dei lipidi e la composizione della cheratina del canale del capezzolo varia con il processo di mungitura (Bitman et al., 1991), tra bovine in lattazione e in asciutta (Bitman et al., 1988), e soprattutto in base alla gravità dell'IMI. Nel caso di infezioni subcliniche è risultato che non ci sia un'influenza sul contenuto lipidico della cheratina, viceversa in condizioni di una manifestazione clinica, è stata evidenziata sia un contenuto maggiore di lipidi totali (Miller et al., 1992) sia una composizione lipidica simile di quarti non infetti (Wood et al., 1990). Inoltre, il latte da quarti affetti da mastite clinica mostra una minore quantità di acidi grassi liberi a catena corta e una maggiore di polinsaturi (Miller et al., 1992). Recentemente è stata dimostrata la funzione sentinella del canale mammario verso gli agenti patogeni invasori poiché il tessuto del canale risponde rapidamente e intensamente, con l'espressione di diversi recettori Toll-like (TLR) e con la produzione di citochine e peptidi antimicrobici (Rinaldi et al, 2010; Whelehan et al., 2011). Eventuali danni alla cheratina, dovuti a terapie di infusione non corrette e/o a difetti nell'impianto di mungitura (Capuco et al., 1994), aumentano la suscettibilità del canale all'invasione batterica e alla successiva colonizzazione (Bramley e Dodd, 1984). In realtà, l'efficacia antimicrobica della cheratina è limitata (Paulrud, 2005; Capuco et al., 1992) e, nonostante la potente protezione fisica e chimica del canale, ci sono diversi modi in cui i batteri possono penetrare e causare un'infezione, tanto che un certo numero di agenti patogeni è in grado di colonizzare il canale per periodi prolungati come lo *Staphylococcus aureus* e il *Corynebacterium bovis*. Oltretutto sempre durante la mungitura meccanica alcuni microrganismi possono insediarsi nella cisterna e dare vita al contagio da parte di patogeni.

1.4.2 Immunità innata e acquisita

La mammella è protetta sia da meccanismi di immunità innata/aspecifica sia da meccanismi di immunità acquisita/specifica. L'immunità innata rappresenta la risposta immediata dell'organismo a

un insulto esterno, la prima linea di difesa contro i patogeni, una volta che questi hanno superato la barriera fisica del canale. Si manifesta in tempi di risposta brevissimi, dell'ordine di alcuni secondi, e ha perciò una funzione molto ampia, in grado di rispondere a un qualunque danno tissutale, e di neutralizzare un'ampia varietà di microrganismi potenzialmente pericolosi. Il processo crea una cascata di segnali di trasduzione intracellulari che conducono a una *upregulation* di molti componenti, quali leucociti, molecole di adesione e citochine (Akira and Takeda, 2004; Akira et al., 2006; Bannermann et al., 2005). L'immunità adattativa ha una risposta decisamente rallentata rispetto a quella innata, dell'ordine di alcuni giorni, ma la sua funzione è specifica per una determinata infezione e può essere più intensa se l'organismo è stato sottoposto a ripetute esposizioni allo stesso microbo. I due sistemi immunitari cooperano in modo sinergico per fornire una protezione ottimale da minacce esterne e conservare la bovina in salute. Molti studi sono stati effettuati sul funzionamento del sistema immunitario (Mallard et al, 1998; Sordillo and Streichner, 2002; Aitken et al., 2011).

Una grande varietà di componenti legati alla risposta immunitaria innata sono stati identificati nel latte, compresi i componenti della difesa cellulare (ad esempio leucociti), componenti che contribuiscono alla difesa umorale [ad esempio, sistema del complemento (CS), fattori immunomodulanti (citocine pro e anti-infiammatorie), lattoferrina (LF), transferrina (TF), lisozima (LZ)], oligosaccaridi, gangliosidi, i ROS, proteine di fase acuta (APP) (ad esempio, aptoglobina e siero amiloide A), ribonucleasi e una vasta gamma di proteine e peptidi antimicrobici. Molti di questi componenti provengono da cellule specializzate che migrano verso la MG (Stelwagen et al., 2009; Uthaisangsook et al., 2002).

I leucociti vitali all'interno della mammella offrono un certo grado di protezione cellulare contro l'invasione microbica attraverso la loro capacità di riconoscere microrganismi e di indurre una rapida risposta infiammatoria nel tentativo di risolvere rapidamente l'IMI. Quindi, i leucociti residenti nella MG sembrano fornire una funzione di sorveglianza nella ghiandola sana.

Oltre alle funzioni microbicide di fagocitosi, i globuli bianchi secernono una varietà di componenti legati all'immunità nel latte comprese le citochine, le chemochine, i ROS e proteine e peptidi antimicrobici (LF, defensine e catelicidine) (Singh et al., 2008). I leucociti inoltre aiutano nella riparazione dei tessuti danneggiati causati dai processi di *shedding* o di rinnovamento (Kehrli and Shuster, 1994). Nonostante la presenza di un numero considerevole di cellule immunitarie nella mammella è stato suggerito che, in realtà, si tratta di un tessuto immunocompromesso rispetto al resto del corpo (Hurley et al., 1990). Inoltre, è stato dimostrato che le attività delle popolazioni leucocitarie nel latte sono ridotte rispetto a quelle più attive del sangue (Taylor et al., 1994; Lee et

al., 1980; Weber et al., 1983). La migrazione di cellule immunitarie durante l'IMI insieme alla desquamazione dell'epitelio mammario determina un aumento della conta delle cellule somatiche (SCC) nel latte, accompagnato da una riduzione della produzione di latte pari alla gravità del processo infiammatorio (Harmon, 1994; Bradley and Green, 2005).

1.4.3 Geni e immunità

Come evidenziato in precedenza in molti studi, la risposta immunitaria della ghiandola mammaria verso un agente estraneo è costituita da un complesso insieme di meccanismi, il quale è regolato dalla totalità dell'espressione di una rete di molteplici geni, interconnessi tra loro (Song, 2016).

Le interazioni tra leucociti e l'endotelio vascolare determinano l'efficienza delle risposte infiammatorie dell'ospite durante le malattie infettive. Durante le prime fasi dell'infiammazione, il sistema vascolare esprime diverse citochine proinfiammatorie chemiotattiche, tra cui IL-6 e IL-8 e diverse molecole di adesione, che promuovono l'aderenza dei leucociti e il reclutamento di citochine aggiuntive nei tessuti sottostanti (Sprague e Khalil, 2009). Precedenti studi su vacche da latte hanno anche mostrato un aumento dell'espressione di queste citochine proinfiammatorie e delle molecole di adesione nei tessuti durante il parto e durante la patogenesi di malattie infiammatorie come la mastite (Aitken et al., 2011).

Le citochine sono molecole a basso peso molecolare di origine proteica o glicoproteica con azioni regolatrici o infiammatorie secrete da globuli bianchi e cellule di varia altra natura presenti nel corpo in risposta a una serie di stimoli (Hoffman et al., 2002). Queste proteine svolgono un ruolo nel regolare lo sviluppo di cellule effettrici del sistema immunitario e, in alcune situazioni, possiedono di per se delle funzioni effettrici. Le citochine si legano a recettori specifici sulla membrana di cellule bersaglio, provocando la trasduzione del segnale che in ultima analisi è in grado di modificare l'espressione genica nelle cellule bersaglio stesse (Nicola, 1994). La sensibilità della cellula di destinazione ad una particolare citochina è determinata dalla presenza di specifici recettori di membrana. In generale, le citochine e i loro recettori mostrano un'elevata affinità l'uno per l'altro, con costanti di dissociazione che vanno da 10^{-10} a 10^{-12} M (Nicola, 1994). Poiché la loro affinità è così elevata, le citochine sono in grado di mediare effetti biologici a concentrazioni picomolari. Le citochine regolano l'intensità e la durata della risposta immunitaria stimolando o inibendo l'attivazione, la proliferazione e la differenziazione delle varie cellule e regolando la secrezione di anticorpi o di altre citochine. Come descritto più avanti, il legame di precise tipologie di citochine a cellule bersaglio, generalmente, stimola un'aumentata espressione di recettori per altre citochine e la secrezione di ulteriori citochine, che colpiscono a loro volta nuove cellule target. In

tal modo le citochine secrete anche da un piccolo numero di linfociti attivati da antigene possono influenzare l'attività di numerose cellule coinvolte nella risposta del sistema immunitario. Le chemochine sono un gruppo di citochine a basso peso molecolare che influenzano chemiotassi e altri aspetti del comportamento leucocitario. Le citochine raramente agiscono da sole, e più propriamente, una cellula di destinazione è esposta ad un ambiente contenente una miscela di citochine i cui effetti sinergici o antagonisti combinati possono avere conseguenze molto diverse. In aggiunta, le citochine spesso inducono la sintesi di altre citochine, con una risultante cascata di attivazione. La non specificità delle citochine sembra apparentemente in conflitto con la specificità del sistema immunitario. In realtà la specificità della risposta immunitaria mediata da citochine viene mantenuta da un'attenta regolazione dell'espressione di recettori sulle superfici cellulari (Leonard, 1999).

L'interleuchina 8 (IL-8) è una chemochina pro infiammatoria prodotta da vari tipi di cellule infiammatorie in seguito a stimolazione ed esercita una serie di funzioni su leucociti e particolarmente sui neutrofili, vedi tabella 2.

Appartiene più precisamente alla sottofamiglia di chemochine CXC, che consiste in molecole ormai conosciute per regolare la migrazione di diversi tipi di leucociti, ma anche il movimento di cellule progenitrici ematopoietiche e di linfociti.

Tabella 2. IL-8: tipi cellulari secretori della chemochina e sue funzioni. (Alnaki et al., 2014)

IL-8

Cellule secretrici	Funzioni della chemochina
Monociti	Induce la risposta infiammatoria. E' un potente chemioattrattante, principalmente per i neutrofilii e in misura minore per i linfociti T
Linfociti T	Induce la degranolazione dei neutrofilii
Macrofagi	Aumenta le attività microbicide dei PMNs e stimola la fagocitosi di particelle opsonizzate
PMNs*	
Cellule epiteliali della GM	
Cellule endoteliali	

*PMNs: Polimorfonucleati

Recenti studi dimostrano che l'inibizione di tale chemochina, mediante somministrazione di specifici anticorpi o interruzione del gene codificante per il recettore IL-8, riduce drasticamente l'infiltrazione dei neutrofilii in tessuti in fase di infiammazione acuta. Svolge un ruolo fondamentale nella infiammazione acuta attraverso il reclutamento e l'attivazione di tale componente cellulare ed è secreta da molti tipi di cellule, tra cui monociti, linfociti, granulociti, fibroblasti, cellule endoteliali, cellule epiteliali bronchiali, cheratinociti, epatociti, cellule mesangiali e condrociti. L'IL-8 secreta da tessuti infiammati viene interiorizzata e trasportata attraverso le cellule endoteliali (Middleton et al., 1997).

Esiste una forte relazione inversa tra la capacità della mammella di reclutare dei neutrofilii e l'esito di un'infezione intramammaria. Le bovine che vanno spontaneamente verso la guarigione, mostrano una risposta rapida e massiva di neutrofilii del latte, mentre quelle che mostrano risposte lente o assenti soccombono a forme acute e gravi di IMI (Whelenhan et al., 2011; Concha et al., 1978). In alcuni di questi studi, il tasso di reclutamento dei neutrofilii è anche associato alla capacità delle vacche di recuperare la produzione di latte in quarti infetti e non infetti. Quindi, il corretto funzionamento del sistema-neutrofilii è fondamentale per la prevenzione sia di effetti locali che sistemici dell'infezione sul tessuto secretorio mammario. I neutrofilii svolgono la loro funzione di controllo e difesa efficace contro i patogeni intramammari mediante la marginazione, la migrazione, la fagocitosi, il respiratory burst e la degranolazione. La marginazione e la migrazione dei neutrofilii

sono fondamentali per la sorveglianza immunitaria innata e il contenimento della risposta infiammatoria al sito di infezione (Figura 3). La fagocitosi, il respiratory burst e la degranulazione culminano nell'eliminazione di agenti patogeni intracellulari da parte dei neutrofilii del latte che sono migrati dal sangue al centro dell'infezione.

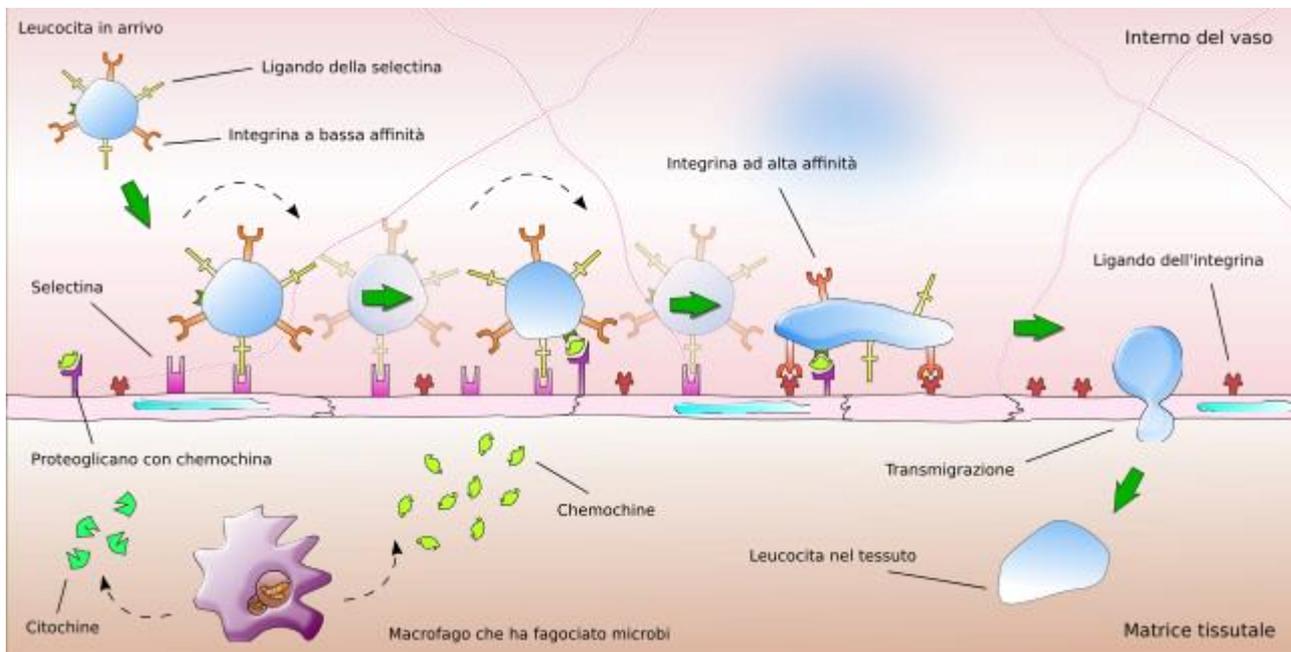


Figura 3. Extravasazione leucocitaria (wikipedia).

Un'espressione adeguata e l'attivazione sequenziale delle molecole L-selectina (CD62L) e Mac-1 (CD11b, CR3) sono fondamentali per il reclutamento dei neutrofilii dalla circolazione sistemica verso la ghiandola mammaria durante una risposta infiammatoria. La CD62L appartiene a una famiglia di proteine di adesione, che si lega a frazioni di carboidrati sialilati sulle glicoproteine, e media il contatto iniziale e il rolling di neutrofilii lungo le pareti dell'endotelio microvascolare.

Dopo la stimolazione dei neutrofilii da parte di chemioattrattanti la proteina viene tagliata dalla superficie cellulare, presumibilmente per consentire una più rapida uscita dal sistema vascolare.

Le molecole di adesione però non svolgono solo un ruolo durante il processo migratorio, infatti la L-selectina è anche coinvolta nel segnale di trasduzione che porta alla generazione del superossido, nell'attivazione del CD11b e nell'induzione del mRNA per diverse citochine (Laudanna et al, 1994; Crockett-Torabi et al., 1995).

I processi di resistenza dell'immunità innata basale non sono ancora stati ben definiti: i fattori specifici che promuovono questa resistenza sono in gran parte sconosciuti e c'è mancanza di informazioni dettagliate sui meccanismi molecolari che la rafforzano verso gli agenti patogeni. Tale

resistenza basale è una difesa strutturale, fondata sulle caratteristiche meccaniche della cellula, il cui componente centrale è l'actina del citoscheletro. Il citoscheletro è cruciale per la riorganizzazione della membrana cellulare durante l'ingresso di agenti patogeni nella cellula, ma organizza anche le difese dell'ospite. L'actina predispone il riconoscimento dei patogeni da parte dei recettori e recluta gli intermediari di segnali cellulari, sottende alla migrazione cellulare e ai movimenti vescicolari e media i movimenti della membrana in processi come l'endocitosi, mediante l'increspatura della membrana e la fagocitosi. Sono state identificate un centinaio di proteine legate all'actina (ABP= actin binding proteins), che regolano la nucleazione e la polimerizzazione dell'actina monomerica per formare fibre e strutture di ordine superiore, o in alternativa, per reciderne le fibre rimodellando il citoscheletro (dos Remedios et al., 2003).

La gelsolina (GSN) è una ABP, costitutivamente espressa, che risiede in una conformazione chiusa fino all'attivazione, quando si lega e separa i grandi filamenti di actina, alterando la forma della cellula ed accelerando le estroflessioni cellulari durante la motilità (Lu et al., 1997; Safiejko-Mroccka e Bell, 2001) (Figura 5). La GSN ha anche l'abilità di legarsi alle estremità dentate dei filamenti e innescare la nucleazione della actina, permettendo la formazione di lamellipodi e coppe fagocitiche (Arora et al., 2005; Groves et al., 2008; Mazur et al., 2010). Inoltre, è implicata nello scambio di segnali dalla membrana al citoscheletro, innescati dal legame fosfolipidico (Lin et al., 1997; Sun et al., 1997). Attraverso queste funzioni controlla la morfologia cellulare, la migrazione, l'invasione e il movimento della membrana cellulare.

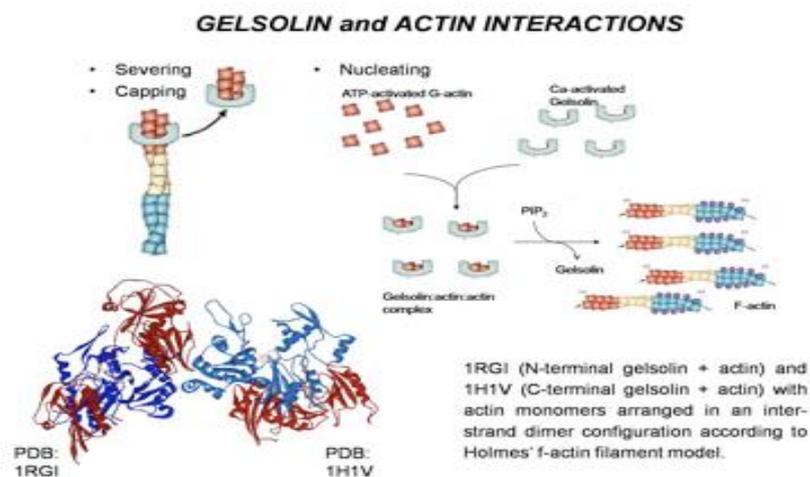


Figura 4. Interazione tra GSN e actina (<https://alchetron.com/Gelsolin>)

1.5 LATTE

Da un punto di vista chimico-fisico il latte è una matrice composta da molteplici componenti, suddivisibile in quattro frazioni, in equilibrio instabile tra loro (Corradini C., 1995): - una frazione acquosa, dove sono disciolti zuccheri, sali minerali, composti azotati non proteici, aminoacidi liberi e vitamine idrosolubili; - una frazione globulare, rappresentata dai globuli di grasso, costituiti da trigliceridi rivestiti da una membrana di natura fosfolipidica e proteica; - una frazione micellare, costituita dalle varie caseine; - una frazione colloidale, costituita da fosfato tricalcico e da α e β lattoglobuline.

I componenti principali del latte sono il lattosio, i lipidi e le proteine.

1.5.1 Il lattosio

Il lattosio è un disaccaride formato da una molecola di glucosio e da una di galattosio legate tramite un legame beta 1-4. Esso viene sintetizzato nelle cellule secernenti della ghiandola mammaria a partire dal glucosio ematico. Il lattosio nel latte di ciascuna specie si mantiene piuttosto costante; per esempio nel latte di vacca la sua percentuale è del 5% circa. Durante un'infezione del tessuto mammario la presenza nel latte di tutti i componenti che vengono sintetizzati nella mammella (lattosio compreso) cala vistosamente, in conseguenza dell'alterata funzionalità delle cellule secernenti e, contemporaneamente, aumenta la presenza nel latte dei componenti di origine ematica (acqua compresa) a causa dell'alterata permeabilità delle membrane.

1.5.2 I lipidi

I lipidi sono sostanze caratterizzate da insolubilità in acqua e solubilità in solventi organici non polari. La frazione lipidica del latte bovino presenta una percentuale di grasso che varia dal 3,5 al 4%, con ampie oscillazioni individuali e stagionali, e si ritrova nel latte come emulsione, sotto forma di globuli sferici, la cui sintesi avviene a livello delle cellule secernenti dell'epitelio della ghiandola mammaria (McPherson et al., 1983; Walstra et al., 1984; Danthine et al., 2000; Secchiari et al., 2002). È la componente più variabile in funzione dello stadio di lattazione, dell'alimentazione, della razza, delle caratteristiche lattifere individuali e delle condizioni ambientali. La sostanza grassa è sintetizzata in parte nella ghiandola mammaria, a partire da acidi grassi volatili sintetizzati nel rumine (da C4 a C14), e in parte da acidi grassi provenienti dalla dieta (C18), mentre il C16 deriva per metà dalla dieta e per metà dalla sintesi *de novo*. I grassi sono

mediamente rappresentati da - trigliceridi 98% (lipidi neutri); - fosfolipidi 1% (lipidi complessi o polari); - sostanze insaponificabili < 1%. Per quanto riguarda la composizione degli acidi grassi, il grasso del latte è uno dei componenti più complessi, essendo costituito da 150 acidi grassi diversi, presenta una proporzione pari a circa 2/3 di acidi grassi saturi ed 1/3 di acidi grassi insaturi e una specifica proporzione elevata di acidi grassi volatili a basso peso molecolare. Nel grasso del latte sono presenti principalmente gli acidi grassi a numero pari di atomi di carbonio compresi tra il C4:0 e il C20:0, mentre quelli a numero dispari sono presenti solo in tracce. Quasi tutti gli acidi grassi saturi hanno un numero pari di atomi di carbonio, dal momento che il punto di partenza della loro sintesi è l'acido acetico (C2:0). Inoltre quelli compresi tra C4:0 e C10:0 e una parte del C12:0 sono volatili, se presenti allo stato libero, cioè non esterificati con la glicerina e sono molto importanti, in quanto influenzano le caratteristiche organolettiche del latte e la qualità dei prodotti caseari, essendo, ad esempio, responsabili della formazione dell'aroma (Poveda et al., 1999).

Gli acidi grassi possono essere classificati in base alle catene carboniose alifatiche, secondo diversi parametri quali il numero di atomi di carbonio che compongono la molecola, la presenza o assenza di doppi legami e la presenza o meno di acidi grassi essenziali. In base al numero di atomi di carbonio possono essere suddivisi in: • acidi grassi a catena corta (4-8 carboni) • acidi grassi a catena media (10-14 carboni) • acidi grassi a catena lunga (16 e più carboni). In base alla presenza/assenza di doppi legami: • acidi grassi saturi privi di doppi legami nella catena (SFA) • acidi grassi insaturi con 1 o più doppi legami tra cui i monoinsaturi (MUFA) ed i polinsaturi (PUFA). In base al fatto che siano essenziali o meno: • omega 9, C18:1, acido oleico con doppio legame in cis-c9 • omega 6, C18:2, acido linoleico con doppio legame in c9, c12 • omega 3, C18:3, acido linolenico con doppio legame in c9, c12, c15.

1.5.3 Le proteine

Le proteine sono sintetizzate da amminoacidi derivanti sia dal sangue e sia dalla sintesi delle cellule epiteliali. Le proteine specifiche mammarie sono costituite principalmente da caseine diverse, α 1-, α 2-, β - e κ -caseina, e di due siero proteine, α -lattalbumina e β -lattoglobulina. Circa l'80% delle proteine sono caseine e il 20% sono proteine del siero di latte. Il contenuto totale di proteine varia tra il 3,0 e il 3,6%.

1.5.4 Componenti minori

Oltre ai suddetti componenti principali, nel latte ci sono molti altri composti presenti in basse concentrazioni: come i minerali (calcio, potassio, sodio, cloruro, magnesio, zinco), fosfati, acido citrico, vitamine e diversi tipi di enzimi, sia nativi, escreti cioè dalla ghiandola mammaria stessa sia di origine microbiologica. I sali presenti nel latte sono principalmente fosfati, citrati, cloruri, solfati, carbonati e bicarbonati di sodio, potassio, calcio e magnesio. Altri elementi, come rame, ferro, silicio, zinco e iodio sono presenti in tracce. Le proteine stesse possono essere incluse tra i sali, avendo dei gruppi carichi positivamente e negativamente che possono formare sali con i controioni, ma di norma non vengono trattate come tali.

Infine c'è la componente cellulare, denominata cellule somatiche, che comprende le cellule epiteliali di sfaldamento dagli alveoli mammari e i leucociti, quali macrofagi, linfociti e soprattutto neutrofilo polimorfonucleati.

1.5.5 La spettroscopia del medio infrarosso (MIR): un metodo high throughput

La necessità di metodi di analisi chimica rapidi, economici e ad alto rendimento ha portato all'applicazione della spettroscopia del medio infrarosso (MIR) anche al settore zootecnico. La tecnica spettroscopica si basa sullo studio dell'interazione tra materia e onde elettromagnetiche. La radiazione elettromagnetica comprende diverse regioni in base alle seguenti lunghezze d'onda: regione dei raggi x (0,5-10 nm), regione UV (10-350 nm), regione visibile (350-800 nm), regione del vicino infrarosso (800-2,500 nm), regione del medio infrarosso (2.500-25.000 nm), regione a microonde (100 μm -1 cm) e regione di frequenza radio (1 cm-1 m). A partire dagli anni '80, gli spettrofotometri a infrarossi a trasformata di Fourier sono stati combinati con personal computer e questo metodo di analisi è diventato ampiamente utilizzato per la sua versatilità e convenienza. Da allora, molti studi hanno evidenziato le relazioni tra le lunghezze d'onda degli spettri e le diverse caratteristiche qualitative e quantitative, mediante la spiegazione dei moti dei legami chimici. Nella regione del medio infrarosso, quando la materia è attraversata dalla radiazione elettromagnetica, i legami delle molecole compiono movimenti (vibrazione e rotazione), che comportano un assorbimento più o meno marcato dell'energia fornita. Sulla base dell'energia fornita e della quantità assorbita dal campione irradiato e utilizzando pretrattamenti matematici di spettri, è possibile predire la composizione chimica del campione e i composti correlati.

Il componente più importante di uno spettrofotometro FT-MIR è senza dubbio l'interferometro di Michelson, costituito da un sistema di specchi che suddivide la radiazione elettromagnetica in due

raggi distinti. Un raggio è indirizzato verso uno specchio fisso e l'altro verso uno specchio mobile che si muove a velocità costante. I due specchi riflettono i due raggi che si ricombinano dando luogo a fenomeni di interferenza costruttiva e distruttiva in base alla differenza del cammino ottico percorso dai due raggi. Dopo che il raggio ricombinato è passato attraverso il campione in esame, viene rilevato da un detector e viene registrato un interferogramma costituito da un'onda sinusoidale il cui periodo varia con la frequenza della radiazione che lo ha prodotto. Descrive la variazione di intensità del segnale in funzione del cammino ottico e quindi del tempo, dato che il cammino ottico dipende dalla velocità di movimento dello specchio mobile.

L'interferogramma viene poi trasformato digitalmente tramite l'algoritmo della Trasformata di Fourier:

$$B(\nu) = \int I(\delta) \cos(2\delta\nu) d\delta$$

dove $B(\nu)$ è l'intensità del segnale in funzione della frequenza, $I(\delta)$ è l'intensità della radiazione che giunge al rivelatore e δ è il ritardo ottico, ovvero la differenza tra i cammini ottici. Si ottiene così uno spettro dell'intensità del segnale $B(\nu)$ in funzione della frequenza. Lo spettrofotometro FT-MIR registra il segnale sia della sorgente che del campione in esame, applicando ad entrambi la Trasformata di Fourier. Lo spettro finale, ottenuto dal rapporto tra lo spettro del campione e quello della sorgente, presenta picchi in trasmittanza % in funzione del numero d'onda (cm⁻¹). In questo modo si è ottenuto uno spettro registrato in modo simultaneo alle varie frequenze della regione spettrale considerata.

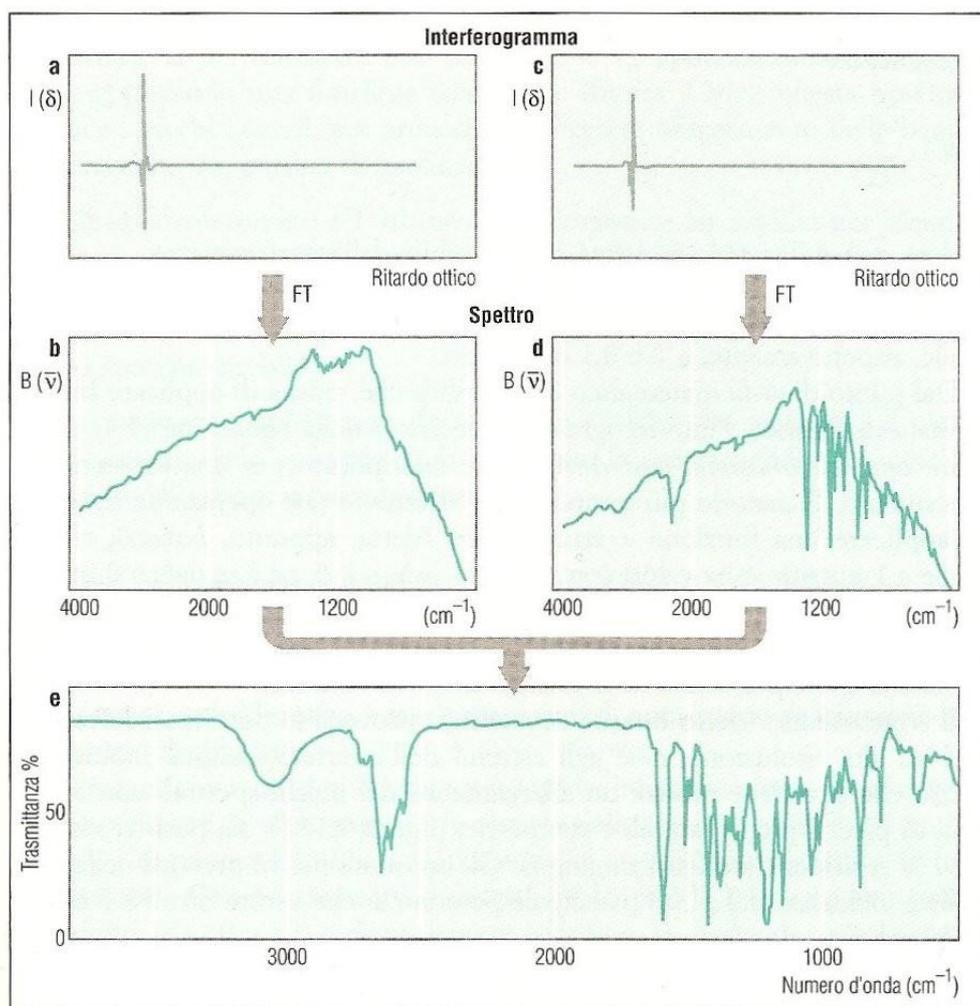


Figura 5. Schema di acquisizione di uno spettro FT MIR (Cozzi, 2001)

Quando viene registrato lo spettro di una miscela di componenti quale può essere il latte, l'assorbanza a una singola lunghezza d'onda è in teoria calcolata come una funzione additiva di ogni concentrazione dei componenti, in accordo con la legge di Beer. In questo modo si assume che non esistano fenomeni di interferenza tra i diversi componenti della miscela. Una semplice calibrazione che utilizza la legge di Beer non è però attuabile in quanto non si conosce l'intera composizione della miscela. È quindi necessario utilizzare metodi di regressione multipla abbinati ai metodi chemiometrici che permettono di costruire modelli di predizione della composizione di un analita in una miscela senza conoscere le quantità degli altri componenti.

La predizione del profilo acido del latte tramite spettroscopia FT-MIR è stata effettuata correlando lo spettro con valori di riferimento degli acidi grassi, determinati tramite estrazione chimica, derivatizzazione e caratterizzazione per via gascromatografica.

Con l'analisi multivariata si arriva poi alla costruzione di un modello predittivo per la quantificazione dei diversi componenti.

La migliore accuratezza è stata osservata per le equazioni predittive di C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18: 1 trans, C18:1 cis-9, C18:1 cis, e per alcuni gruppi di FA studiati nel latte (saturi, monoinsaturi, insaturo, a catena corta, media e lunga). Queste equazioni mostravano un coefficiente di determinazione maggiore di 0,95, mentre per i PUFA era uguale a 0.85 (Soyeurt et al., 2006).

Attualmente, il MIR viene utilizzato per determinare la qualità in campioni di latte di massa e di singoli animali. In particolare, in molti Paesi si utilizza il MIR nei controlli funzionali ufficiali del latte bovino per determinare il contenuto di proteine, caseina, grassi, lattosio ed urea. Oltre a questi parametri tradizionali, il MIR è anche utilizzato per prevedere molteplici altre caratteristiche del latte, tra cui la composizione acidica (Soyeurt et al., 2006, 2008, Rutten et al., 2009; De Marchi et al., 2011; Ferrand et al., 2011), la composizione proteica (Luginbuhl, 2002; Etzion et al., 2004), la composizione minerale (Soyeurt et al. ., 2009) e la concentrazione dei corpi chetonici (Heuer et al., 2001; de Roos et al., 2007; van Kneysel et al., 2010; van der Drift et al., 2012).

1.5.6 Fattori che influenzano la qualità del latte

La composizione del latte è molto variabile, essendo condizionata dalla complessa attività metabolica dell'animale, da fattori nutrizionali, e da fattori ambientali: tra questi intervengono, in maniera più o meno pronunciata la razza, l'età dell'animale, il suo stato di salute, l'alimentazione, lo stadio di lattazione, la tecnica di mungitura, le condizioni ambientali e le stagioni.

I fattori che influiscono sulla qualità e sulla composizione del latte possono essere suddivisi in:

Fattori endogeni: a loro volta suddivisibili in base alla genetica, quindi legati al singolo individuo e alla razza, in base alla fisiologia, quindi allo stato di salute dell'animale in quel particolare momento e allo stadio di lattazione.

Fattori esogeni: relazionati al sistema di allevamento, come stabulazione, tecnica e tempi di mungitura, alimentazione ed infine anche al clima.

Tutti questi fattori non agiscono indipendentemente gli uni dagli altri, ma interagiscono continuamente tra loro (Comba et al., 1995).

Sia il tenore in grassi sia quello in proteine del latte, sono determinati per il 40% dalla genetica (ereditabilità) e per il 60% dall'ambiente, mentre le produzioni di latte, grasso e proteine (kg di grasso e proteine prodotti in lattazione) sono determinate dalla genetica per un 25–30% e

dall'ambiente per un 70–75% (Salvadori del Prato, 1998). La composizione del latte risente anche dello stato di salute dell'animale, infatti, i fenomeni infiammatori provocano una diminuzione e un'alterazione dei contenuti del latte. Le componenti che presentano minore variabilità sono il lattosio e i sali minerali che sono indici utilizzati per l'individuazione di latti normali. Le infiammazioni intramammarie provocano inoltre, una diminuzione della capacità di sintesi della ghiandola mammaria, con conseguente diminuzione dei contenuti di grasso, caseina, lattosio e un aumento dei prodotti di filtrazione diretta dal plasma sanguigno (sieroproteine, sali minerali, enzimi, etc.), determinato da una maggiore permeabilità dei capillari (Corradini, 1995). Spesso però si può notare più che una diminuzione di sintesi dei suddetti componenti, un aumento relativo, dovuto all'effetto concentrazione.

L'alimentazione influenza notevolmente la qualità del latte soprattutto in termini di contenuto lipidico (Ubertalle et al., 1998). Infatti, la composizione acidica dei lipidi del latte dipende dal tipo e dalla quantità di precursori per i processi di sintesi, che arrivano a livello mammario dalla dieta. L'assunzione di quantità insufficienti di fonti di energia provoca, ad esempio, una mobilitazione dei grassi di riserva sotto forma di acidi grassi liberi (FFA), i quali sono captati dalla mammella ed incorporati nel grasso del latte con conseguente incremento dei grassi ad elevato peso molecolare, e in particolare di acido oleico (Pulina et al, 2007). Sebbene l'alimentazione detenga quindi un innegabile ruolo fondamentale sul profilo acidico del latte è stato evidenziato in molteplici lavori l'interconnessione biunivoca con il sistema immunitario. Cambiamenti nella composizione acidica delle cellule immunitarie influenzano in vari modi la risposta sia innata sia adattativa. Modificando gli acidi grassi che compongono i fosfolipidi della membrana cellulare si modifica la fluidità e la funzionalità della cellula immunitaria, e l'alterazione della natura fisica della membrana si riflette ad esempio sull'attivazione dei linfociti e sulla produzioni di anticorpi, quindi sulla risposta immunitaria (Sordillo, 2016). Oltretutto molti acidi grassi regolano attivamente *pathways* di segnali intracellulari e l'attivazione di fattori di trascrizione, inducendo perciò una variazione dell'espressione genica (Erridge and Samani, 2009; Lee et al., 2010 vedi Sordillo 2016). A prescindere dal meccanismo di azione, sia i SFA che i PUFA mostrano un effetto sulla risposta infiammatoria attraverso una modificazione di alcuni geni cruciali quali IL-1, TNF-alfa e PTGS2 (Lee et al., 2010).

Le infezioni intramammarie causano, oltre all'aumento delle immunoglobuline, un incremento delle cellule somatiche nel latte proporzionale all'intensità del fenomeno infiammatorio con conseguente arricchimento di enzimi di origine cellulare. In una ghiandola mammaria non infetta, il SCC è basso e i macrofagi sono le cellule predominanti nel latte rappresentando circa il 60% delle cellule somatiche totali con il restante 12% costituito da neutrofili e il 28% dei linfociti (Burvenich et al.

1995; Napel et al., 2009). Dopo l'infezione microbica, circa 6 ore dopo il rilascio dell'endotossina batterica, le cellule somatiche aumentano drasticamente da 10^5 fino a oltre 10^6 cell/ ml (Kehrli e Shuster 1994). In questa fase la maggior parte delle cellule è costituita da neutrofilo (> 90%), che rimangono il tipo di cellula principale fino a 59 ore dopo l'infusione (Saad & Ostensson 1990). Secondo Van Werven et al. (1997) la conta cellulare può necessitare di circa 3 settimane per ritornare ad una concentrazione normale, dopo ovviamente, l'efficace eliminazione dei microrganismi.

1.5.7 Parametri tradizionali per valutare lo stato di salute della mammella

Un animale sano ha un conta cellulare (SCC) sicuramente inferiore alle 200.000 cellule/mL, e secondo gli ultimi studi il 95% degli animali sani presenta una SCC al di sotto delle 100.000/mL. Quindi, qualora la conta si alzi al di sopra delle 200.000/mL significa che nella mammella è in atto un processo infiammatorio. Tenere sotto controllo con cadenza regolare (in genere mensile) l'andamento delle cellule somatiche in azienda appare dunque un requisito minimo per garantire una produzione qualitativamente elevata ed economicamente vantaggiosa. La misurazione regolare delle cellule somatiche si può effettuare a livello del singolo animale, per monitorare il singolo capo e valutare l'eventuale insorgenza di infezioni, oppure dalla cisterna aziendale, per stimare la qualità della produzione aziendale e valutare la necessità di un intervento qualora siano superati i limiti prestabiliti (Figura 6).

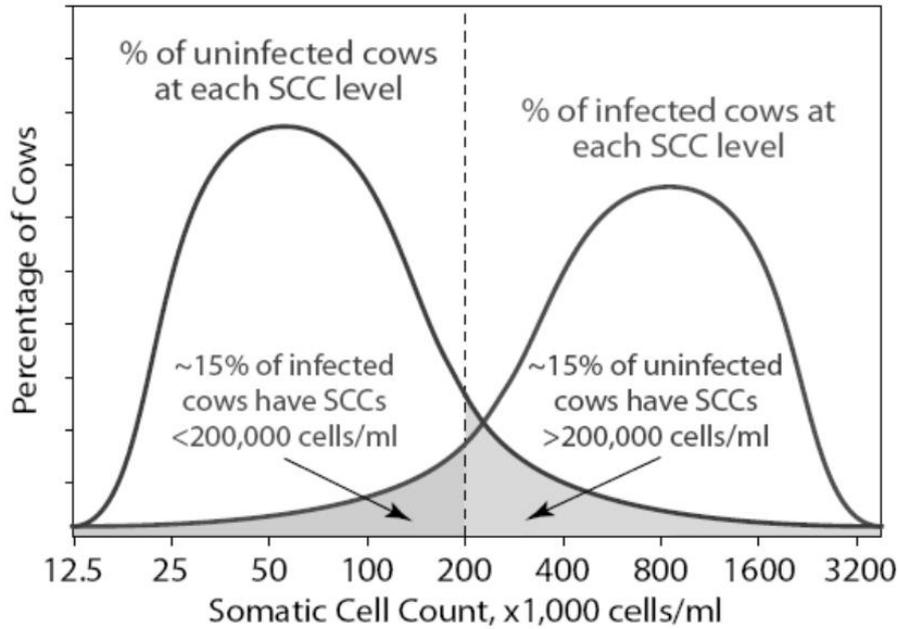


Figura 6. Relazione tra SCC e stato di infiammazione della mammella (Dairyman's digest, Winter 2009)

Come già stabilito nel 1999 da Barkema, gli allevatori definiti “puliti e accurati”, che caratterizzavano il loro management con misure adeguate (come il trattamento idoneo di tutti gli animali in asciutta, la precisione nei prelievi di latte da inviare in laboratorio per le analisi microbiologiche, una maggiore pulizia degli ambienti, ecc.), potevano sempre mantenere una carica cellulare inferiore alle 150.000/mL. Viceversa gli allevatori definiti “veloci e sporchi” avevano una conta di cellule somatiche tra le 250.000/mL e le 400.000/mL.

L'influenza della SCC sulla qualità del latte si realizza attraverso i mediatori chimici che possono danneggiare le cellule secernenti della ghiandola mammaria, modificandone le funzionalità, attraverso la presenza di tossine batteriche che danneggiano le pareti dei vasi sanguigni, favorendone la permeabilità e attraverso enzimi idrolitici che scindono i componenti del latte.

L'infezione mammaria provoca dunque un afflusso di leucociti dal sangue, prevalentemente di neutrofili, a cui si affianca l'alterazione della funzionalità mammaria, come descritto precedentemente, di cui le cellule somatiche sono un fedele indice. Per questo motivo le cellule somatiche sono riconosciute come standard di qualità del latte prodotto a livello internazionale, sia da un punto di vista scientifico sia legislativo.

Le infezioni sub-cliniche sono un problema tutt'altro che risolto in Italia soprattutto nell'ambito della prospettiva della riduzione dell'uso sistematico di antibiotici alla messa in asciutta. E' infatti in questa fase che vengono utilizzati circa il 60% degli antibiotici destinati a questi animali. Da

un'elaborazione dell'ufficio studi dell'Associazione Italiana Allevatori (AIA) dei dati delle cellule somatiche delle singole vacche emerge un quadro piuttosto inquietante. In Italia, nel 2016, hanno partecipato alla selezione genetica per la sola razza frisona 11.123 allevamenti, per un totale di 1.106.461 vacche. Negli anni 2012, 2013, 2014 e 2015 oltre il 30% di queste bovine ha avuto una concentrazione di cellule somatiche nel latte > 300.000 /ml, e per cinque mesi l'anno (da Giugno a Ottobre) superiore alle 400.000/ml. La percentuale di bovine che in questo lungo arco temporale ha avuto più di 200.000 cellule somatiche/ml è stata superiore al 30%. A ognuna di queste bovine nel corso dei controlli funzionali, mediamente di frequenza mensile, viene quantificata la presenza di cellule somatiche. Questa informazione è importante per la gestione dell'allevamento, in quanto consente di individuare le bovine con mastite sub-clinica (> 200.000 /ml) e quelle nelle quali la mastite ha ormai cronicizzato.

Oltre alla conta delle cellule somatiche vi sono altri due indicatori di infiammazione mammaria tradizionalmente riconosciuti: l'N-acetil- β -Dglucosaminidasi (NAGasi) e la L-lattato deidrogenasi (LDH).

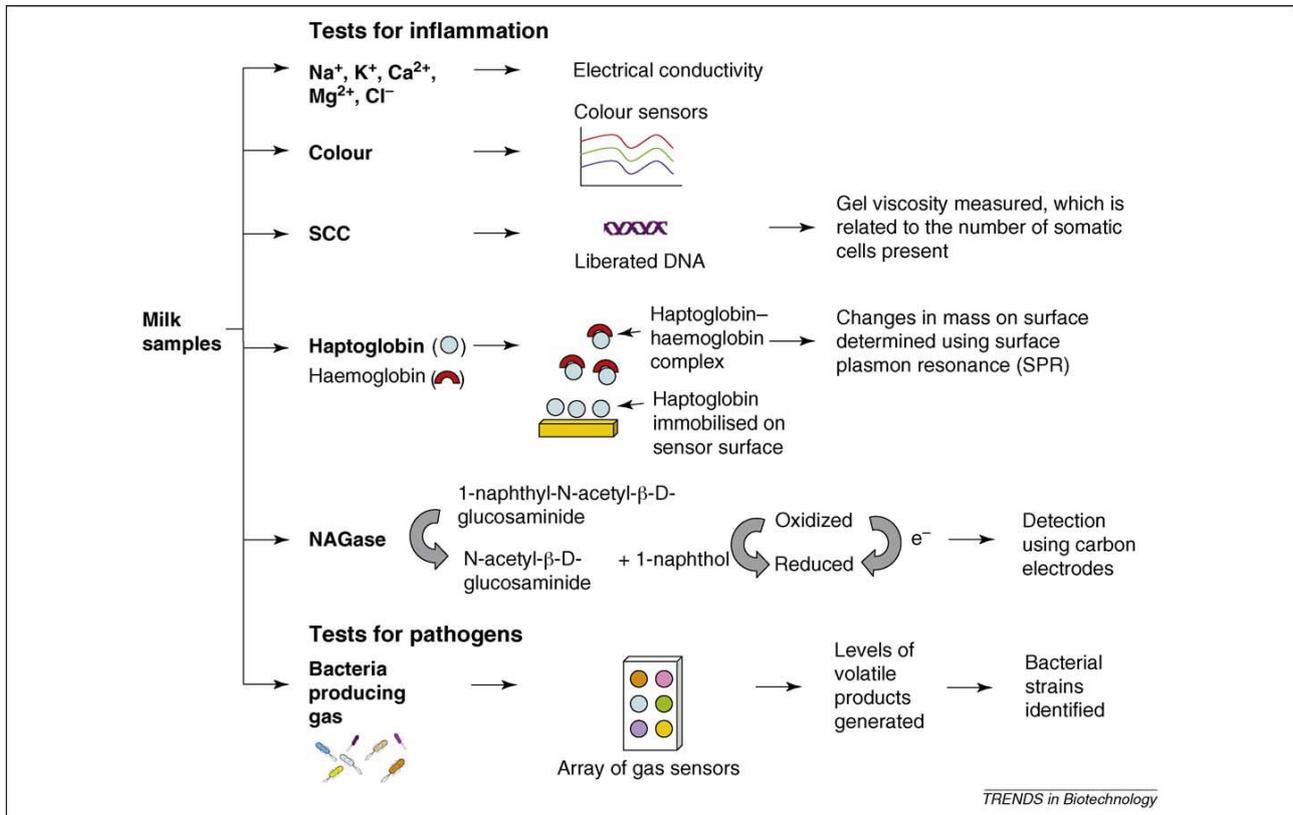
La NAGasi proviene dal citosol delle cellule secernenti delle ghiandole mammarie (Kitchen et al., 1978), è un enzima intracellulare che viene rilasciato dai leucociti polimorfonucleari durante la fagocitosi e la lisi cellulare. Durante una IMI si verifica un aumento del materiale citoplasmatico nel latte a causa del cambiamento di permeabilità nelle membrane plasmatiche delle cellule secernenti insieme a danni tissutali estesi (Chandler et al., 1974).

La L-lattato deidrogenasi (LDH) è un enzima coinvolto nel pathway glicolitico, e si trova nel citoplasma di tutte le cellule e i tessuti del corpo (Chagunda et al., 2006). Ha 5 isotipi (da LDH1 a LDH5) e, nel latte, è stato osservato un aumento della sua concentrazione con la mastite (Bogin et al 1977; Harmon 1994).

Per valutare lo stato di salute dell'animale nel suo complesso si possono poi stimare vari parametri metabolici presenti nel latte: glucosio, glucosio 6 fosfato, β -idrossibutirrato (BHB), isocitrato, urea e acido urico. I primi legati al metabolismo energetico, gli ultimi a quello proteico.

Attualmente esistono dei metodi on-line per il rilevamento delle IMI, come ad esempio la misura della conducibilità elettrica, del colore, alcuni sensori per enzimi o per sostanze volatili, riassunti in Figura 7 ma ancora non risolutivi, non affidabili per una diagnosi certa (Viguiet et al., 2009).

Figura 7. Schema riassuntivo per test online (Viguier et al., 2009).



1.5.8 Il glicoma: un potenziale strumento di monitoraggio della salute animale

Attraverso l'analisi del genoma si è potuta studiare l'informazione genetica globale di un organismo vivente, valutando cosa potrebbe accadere in una cellula in base ai geni presenti o assenti. Con il trascrittoma si sono esaminati i geni che sono attivamente espressi e questo approccio rappresenta una sistema buono per misurare ciò che sembra accadere nelle cellule. Mediante lo studio del proteoma si è potuto descrivere l'insieme delle proteine di un organismo o di un sistema biologico, ovvero le proteine prodotte dal genoma. Infine si è arrivati allo studio del glicoma, come anche del metaboloma e lipidoma, ossia allo studio dei composti che non sono sintetizzati da processi basati su modelli genetici, ma sono invece prodotti da *pathways* biosintetici creati dal proteoma, e in quanto tali, sono i prodotti finali del flusso di informazioni di una cellula e sono eccellenti indicatori di ciò che una cellula sta effettivamente facendo (Figura 8, Taron and Rudd, 2016).

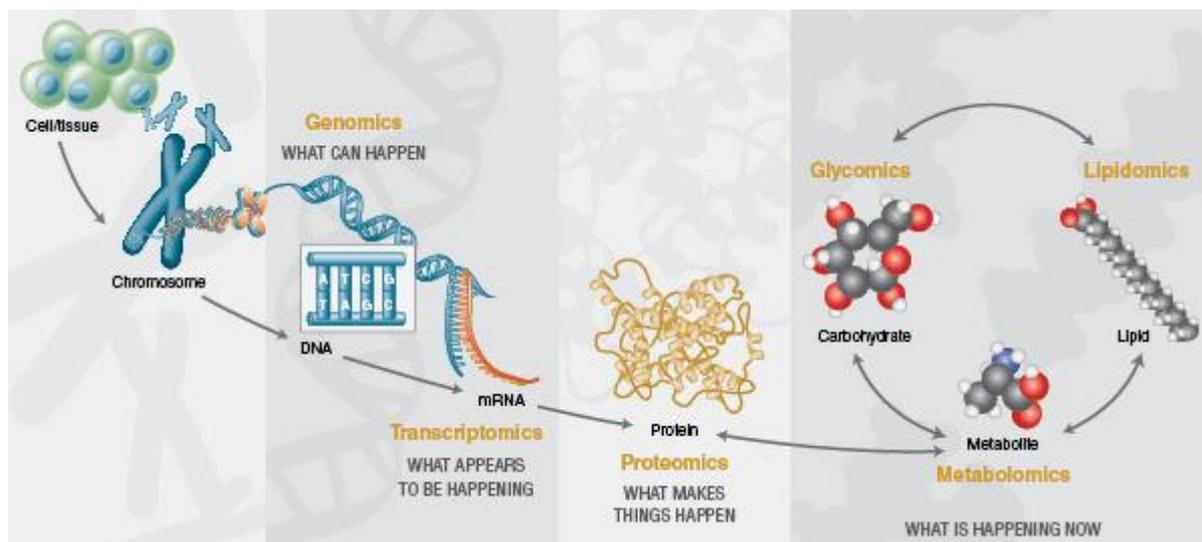


Figura 8. Rappresentazione del flusso di informazioni all'interno di una cellula/organismo (Taron and Rudd, 2016).

Le catene di carboidrati (glicani) legate alle proteine svolgono un ruolo fondamentale nella vita della cellula e dell'intero organismo, in quanto ne regolano importanti processi biologici quali ad esempio l'apoptosi e la sopravvivenza cellulare (Lee et al. 2008; Swindall & Bellis 2011), l'angiogenesi (Tei et al. 2002) e le funzioni effettrici degli anticorpi (Nimmerjahn & Ravetch 2008; Xue et al. 2013; Vidarsson et al. 2014). Ricordiamo infine che molte delle glicoproteine sono destinate a essere proteine di membrana e la componente oligosaccaridica forma il glicocalice, ovvero la struttura più esterna della cellula, coinvolta quindi nei meccanismi di comunicazione cellula-cellula e cellula-ambiente. I glicani subiscono rapidi cambiamenti strutturali in risposta agli stimoli biologici, fornendo un'opportunità unica per identificare e sfruttare i biomarker-glicani per stati patologici, progressione di una patologia ed eventuale risposta alla terapia utilizzata. La diversità e la complessità delle loro strutture forniscono una grande quantità di informazioni sui sistemi biologici: è quindi fondamentale comprendere in dettaglio quali contribuiscono a singole e specifiche funzioni. Sia il numero che la diversità strutturale dei glicani trovati nei mammiferi, sono sfide analitiche significative per la determinazione del loro profilo nei complessi eventi biologici. Inoltre, una visione strutturale completa può fornire lo spunto per molteplici approfondimenti sui meccanismi regolatori proprio per la biosintesi dei glicani stessi. Sono oggi disponibili vari approcci per effettuare analisi sensibili degli N-glicani (cioè quelli che sono legati alle proteine attraverso l'ammino asparagina acida) come la cromatografia liquida con rilevamento della fluorescenza, la spettrometria di massa, e/o una combinazione di entrambe.

Le immunoglobuline (Ig) sono glicoproteine costituite per l'82-96% dalla componente proteica e per il 4-18% da quella glucidica (Vidarsson et al. 2014). Svolgono un ruolo significativo nella protezione della ghiandola mammaria sia direttamente che indirettamente, in particolare concorrendo al potenziamento della fagocitosi leucocitaria. Il loro contenuto nel latte sano è normalmente basso e si innalza nel colostro, per fornire l'immunità umorale al vitello, e nel latte proveniente da mammelle infiammate. Le Ig di tipo G, presenti in maggiore quantità nel latte bovino, sono prodotte da cellule del sistema immunitario adattativo, le plasmacellule e sono formate da 4 catene polipeptidiche a due a due uguali (Figura 9).

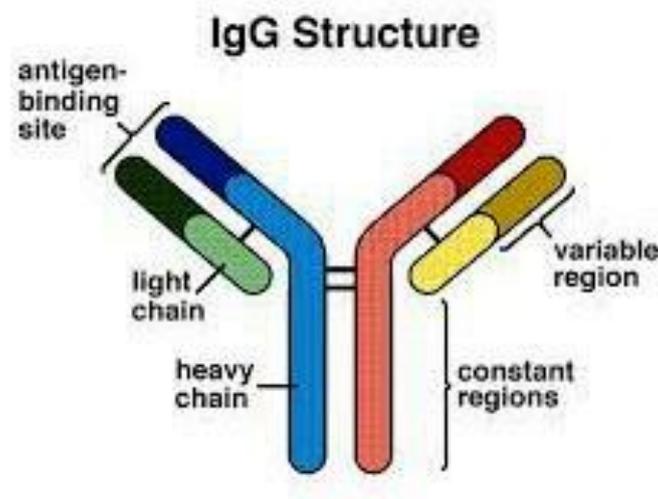


Figura 9. Struttura delle immunoglobuline IgG (<http://www.biologynoteshelp.com/structure-and-functions/>).

Lo studio del profilo della N-glicosilazione dell'immunoglobulina G (IgG), in particolare, è stato molto esaustivo nel contesto di vari studi GWAS (Genome-Wide Association Study), che collegano la glicosilazione con informazioni genetiche nella popolazioni umana.

La tecnica analitica prescelta per ottenere una risoluzione elevata nella separazione dei glicani N-linked rilasciati da glicoproteine è la ultra cromatografia liquida ad alte prestazioni (UPLC). I principali vantaggi dell'analisi UPLC mediante marcatura fluorescente sono l'alta riproducibilità, l'esatta quantificazione relativa, la separazione effettiva degli isomeri e la facilità d'uso (Stockmann, 2013).

1.6 Scopo della tesi

Lo scopo generale della presente tesi è stato quello di studiare le associazioni tra alcune caratteristiche fenotipiche del latte, sia di tipo tradizionale sia innovativo, con la conta delle cellule somatiche del latte, per stimare la possibilità di utilizzare questi parametri per valutare lo stato di salute della ghiandola mammaria e, eventualmente, dell'animale nel suo complesso.

Solitamente i parametri “classici” venivano misurati nel sangue, ma ultimamente la tendenza è quella di preferire la matrice latte per facilitare la collezione e il reperimento dei campioni e per tutelare sia il benessere dell'animale sia l'andamento aziendale.

In quest'ottica è stato effettuato uno studio del latte nelle tre settimane post partum in animali di razza Frisona, allevati presso un'azienda sperimentale. Lo studio si è articolato in due esperimenti paralleli. Nella prima prova è stata considerata l'intera mandria di 45 vacche e sono stati analizzati parametri tradizionali, come il profilo acidico, il contenuto dei minerali e alcuni metaboliti (acetone, citrati e BHB) con la spettroscopia del medio infrarosso, un metodo predittivo e high throughput, e parametri innovativi quali il profilo della N-glicosilazione dell'immunoglobulina G con l'ultra cromatografia liquida ad alte prestazioni. Nella seconda prova sono stati determinati, su 17 bovine della stessa mandria, alcuni parametri tradizionalmente studiati nel latte (BHB, isocitrato, urea, glucosio-6-fosfato, glucosio, SCC, LDH e NAGasi) e l'espressione genica delle cellule somatiche del gene dell'IL-8, della L-selectina e della gelsolina, tutti geni coinvolti nella risposta immunitaria dell'ospite.

Il fine ultimo della ricerca presente è stato rappresentato dall'identificazione di potenziali biomarkers, che possano promuovere la diagnosi precoce e la prevenzione di patologie, fornendo agli allevatori nuovi strumenti per una gestione efficiente e per un miglioramento della produttività.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Animali

La prova è stata effettuata presso la sede di Monterotondo del Centro di ricerca Zootecnia e Acquacoltura del CREA (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria), seguendo le direttive CEE (2010/63) per la protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.

La prova è stata condotta su 45 vacche di razza Frisona Italiana che sono state seguite per un arco temporale di un anno, da dicembre 2014 a dicembre 2015, con parti che si sono succeduti in differenti stagioni e più precisamente nel periodo compreso tra i mesi di febbraio e agosto. I 45 animali contavano sia primipare (8) che pluripare (15 con due parti e 22 con 3 parti).

La razione alimentare (Tabella 3) veniva somministrata mediante tecnica unifeed in un'unica distribuzione giornaliera effettuata al mattino dopo la mungitura e dopo la pulizia e la rimozione dalla mangiatoia di eventuali residui di alimenti.

Tabella 3. Razione alimentare

Razione alimentare	Kg/vacca/giorno
Insilato di sorgo	24
Fieno di erba medica	6
Farina di mais	5
Supplemento proteico (33%)	4.5
Granella di frumento	3.5
Fieno polifita	2
Granella di orzo	1
Supplemento vitaminico-minerale	0.4
Grassi rumino-protetti (84%)	0.3
Bicarbonato di sodio	0.25

Gli animali venivano monitorati settimanalmente dal veterinario.

Le bovine erano sottoposte a 2 mungiture giornaliere ad intervalli di 12 ore (mattino e pomeriggio) in una sala di mungitura con impianto a spina di pesce da 16 posti, con un trattamento sanitario di pulizia del capezzolo, pre e post mungitura. L'impianto era equipaggiato con sistemi di misurazione

e registrazione della produzione di latte individuale. Il sistema calcola con precisione e affidabilità la produzione di ogni animale (approvazione ICAR-APA per i controlli ufficiali), permettendo inoltre con un'unica apparecchiatura di gestire sia automaticamente sia manualmente tutte le funzioni del dispositivo di stacco del gruppo di mungitura.

2.2 Campionamento

I campioni di latte (100 mL) raccolti nelle due mungiture giornaliere venivano miscelati per l'ottenimento di un campione rappresentativo di entrambe le mungiture e inviato con l'aggiunta di un conservante, il bronopol allo 0.02%, ai laboratori dell'AIA per la determinazione delle percentuali di grasso, proteine, lattosio e del contenuto di cellule somatiche, utilizzando i protocolli dei laboratori standard del latte.

2.3 Esperimento 1

In questo primo esperimento il latte è stato campionato da tutte le 45 vacche a 7, 14, 21 e 35 giorni post partum.

I campioni di latte sono stati classificati in 3 gruppi: High, Medium e Low, in base al numero di cellule somatiche determinato ad ogni prelievo. Nel gruppo delle High la SCC era $\geq 500 \times 10^3$ cells/ml, con una media pari a $1943 \pm 1344 \times 10^3$ cells/ml (28 campioni).

Nel gruppo delle Medium la SCC era maggiore di 100×10^3 e minore di 500×10^3 cells/ml, con una media pari a $258 \pm 98 \times 10^3$ cells/ml (44 campioni).

Nel gruppo delle Low la SCC era $\leq 100 \times 10^3$ cells/ml, con una media pari a $61 \pm 27 \times 10^3$ cells/ml (64 campioni).

Si è ipotizzato che il latte classificato nel gruppo Low provenisse da bovine con mammelle sane, mentre tutti gli altri prelievi, provenienti da mammelle con presunta infiammazione in corso. L'ulteriore suddivisione in Medium ed High è stata fatta per evidenziare una possibile condizione fisiologica differente. Inizialmente si era pensato di basarsi sul limite di legge (400×10^3 cells/ml) ma avendo osservato un gap nella continuità dei valori di SCC nell'intorno di 500×10^3 cells/ml, si è preferito prescegliere quest'ultimo valore come cut-off.

2.3.1 Analisi MIR: profilo acidico, minerali e metaboliti

I campioni di latte (50 mL) raccolti separatamente la mattina e la sera, addizionati di bronopol, venivano inviati in Belgio, presso il Centro di Ricerca Agricola della Wallonia, (CRA-W) con spedizione a 4 °C per le analisi MIR.

Le analisi venivano effettuate con uno spettrometro FT6000 della Foss ad alte prestazioni nel medio infrarosso completamente automatico e rispondente alle direttive IDF (International Dairy Federation) ed AOAC (Association of Official Analytical Chemists). La tecnologia FT-IR ivi implementata consente virtualmente di determinare tutti i parametri di macrocomposizione del latte bovino. Lo spettrometro è dotato di un sistema di misurazione sequenziale che permette l'analisi routinaria dei campioni di latte e un sistema di aspirazione che permette di:

- trasportare una quota rappresentativa del campione dalla provetta alla cuvetta;
- filtrare automaticamente il latte per proteggere omogeneizzatore e cuvetta e per evitare che corpi sospesi causino blocchi durante l'analisi;
- omogeneizzare il campione onde evitare errori di campionamento associabili alle diverse dimensioni dei globuli di grasso;
- termostatare il campione;
- mantenere costante la pressione esercitata sulla cuvetta durante l'irradiazione infrarosso.

L'analisi può essere effettuata sia su campioni di latte a cui è stato aggiunto un conservante per evitare il deterioramento dei suoi costituenti, sia su campioni di latte fresco. Quest'ultimo deve essere mantenuto ad una temperatura di 4-5 °C e analizzato entro 72 ore dal prelievo.

Le performance dello strumento MilkoScan FT6000 prevedono una capacità di analisi dai 200 ai 500 campioni ogni ora, un volume di campione prelevato: 5 ml (programmabile tra 3,6 e 9,9 ml) ed una temperatura di lavoro: 37-42°C.

L'acquisizione dello spettro viene effettuata nel medio infrarosso, nella regione compresa tra 925,92 e 5011,54 cm^{-1} (tra 240 e 1290 μm ; 1 cm^{-1} =3,858 μm). La risoluzione spettrale è pari a 3,858 cm^{-1} , pertanto l'intera scansione spettrale viene acquisita con 1060 punti. Lo spettro del latte, registrato in trasmittanza, viene filtrato dai segnali IR relativi all'acqua in quanto, l'acqua assorbe nel medio infrarosso e, ove venga acquisito lo spettro tal quale, i suoi segnali coprirebbero gli assorbimenti specifici della matrice latte. Infine, i valori di trasmittanza vengono convertiti in assorbanza. Lo spettro del campione mattutino è combinato con quello serale per ottenerne quindi uno giornaliero, che tenga conto delle rispettive produzioni in modo pesato. Lo spettro viene acquisito in doppio e i valori medi risultanti sono resi disponibili in un file importabile su altri software. La calibrazione utilizzata per la predizione del contenuto di grasso totale tramite

spettrometro MilkoScan FT6000 è basata sul metodo validato FIL-IDF 141C:2000, basato sull'assorbimento degli specifici gruppi funzionali dei diversi componenti maggioritari del latte. Lo spettrometro Milkoscan FT6000 è implementato con calibrazioni costruite e validate nei laboratori FOSS sulla base di campioni di latte bovino. L'equazione predittiva, precedentemente costruita mediante l'analisi multivariata (PLS), permetteva la quantificazione del profilo acidico e delle varie classi di acidi, tutti riportati in g/100 mL di latte, dei cinque minerali (Na, K, P, Mg e Ca) e di tre metaboliti (BHB, citrati e acetone) (vedi Tabelle 3 e 4 nei risultati). Con il fattore RPD_{cv} (ratio performance/deviation of cross validation), mostrato nelle tabelle 5 e 6 dei risultati, si evidenzia simultaneamente l'accuratezza della predizione e la variabilità globale dei valori di riferimento.

2.3.2 Analisi del profilo dell'N-glicosilazione dell'immunoglobulina G

Per questa analisi, 15 mL di latte del singolo animale venivano centrifugati a 4000 g per 30 min a 4°C senza applicare alcuna velocità di decelerazione. Eliminato il grasso, 5 mL venivano decantati con attenzione in una provetta evitando di alterare il pellet cellulare e poi congelati a -20°C. In duplicato 300ul del campione scongelato venivano filtrati attraverso un filtro di fibra di vetro a 3700 rpm per 10 min e poi collezionati in una piastra da 96 pozzetti.

La purificazione dell'IgG e del rilascio degli N-glicani è stato effettuato mediante una piattaforma robotica della Hamilton utilizzando un protocollo già pubblicato (Stöckmann et al., 2013). La strumentazione è dotata di 96 pipette automatiche e di uno shaker riscaldante, controllabili dal software. Gli N-glicani sono stati separati con un ULPC della Waters e analizzati con il software Empower V3.

La IgG veniva catturata facendo passare il campione filtrato su delle Phytip contenenti una matrice di proteina G. Le colonnine-puntali venivano lavate per 5 volte con un buffer di legame 0.1 M di sodio fosfato a pH = 7.4, i campioni sono poi eluiti con un buffer 0.2 M di glicina-HCl (pH= 2.5) e neutralizzati con un buffer 1 M di Tris-HCl. Le proteine così purificate venivano arricchite unendo i due pozzetti identici, e 100ul sono trasferiti in una piastra da 96 e centrifugati a 3700rpm per 30 min a temperatura ambiente. Venivano poi aggiunti 50 ul di un buffer denaturante (DTT), agitando e lasciandoli per 10 min nuovamente a T amb. I campioni venivano quindi trasferiti nuovamente in una piastra denaturante, incubati a 95°C per 10 min e raffreddati a T_{amb} per 20 min. I campioni denaturati venivano poi ritrasferiti in una piastra, incubati con 20 ul iodoacetammide per 10 min, lavati con 20 ul di bicarbonato di sodio e filtrati. Alla fine si aggiungevano 0.4 ul di PNGaseF ad ogni pozzetto, incubati per 30 min a 38°C sotto agitazione. I glicani rilasciati venivano recuperati con centrifugazione a 3700 rpm attraverso un filtro 10 kDa per 10 min.

8 ul del campione contenente i glicani venivano incubati con 12ul di un marcatore fluorescente (6-amminochinolin-N-idrossisuccinimidil carbammate) a Tamb. In una colonna (Glycan BEH Amide 130Å Column, Waters) venivano quindi iniettati 16 ul di ogni campione e 19 picchi venivano identificati manualmente.

2.3.3 Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza per osservazioni ripetute, usando la procedura MIXED del SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC; release 9.1). Prima dell'analisi si è proceduto alla verifica della normalità della distribuzione di ciascun parametro mediante il test di Shapiro Wilks e, quando necessario, alla normalizzazione dei dati mediante trasformazione logaritmica. Il modello ha incluso fattori fissi quali: ordine di lattazione (P, 3 livelli: primipare, secondipare e pluripare), stagione di parto (S, 3 livelli: primavera, estate e inverno), giorni dal parto (C, 4 livelli: 7, 14, 21 e 35 d) e livello di SCC (H, 3 livelli: High, Medium e Low); mentre l'animale (α) viene considerato come effetto random. La quantità di latte prodotta al controllo dal singolo animale (MY) è inserita come covariata.

Il modello statistico utilizzato è risultato il seguente:

$$Y_{ijklmn} = \mu + P_i + S_j + C_k + H_l + \alpha_m + \beta(MY)_{ijklmn} + e_{ijklmn}$$

in cui: Y_{ijklmn} è la variabile dipendente, μ è la media generale, P_i è l'effetto dell' i -esima lattazione, S_j è l'effetto della j -esima stagione di parto, C_k è l'effetto del k -esimo controllo, H_l è l'effetto del l -esimo livello di SCC, α effetto random dell' m -esima vacca, $\beta(MY)_{ijklmn}$ è l'effetto di regressione della quantità di latte al controllo ed e_{ijklmn} è l'errore casuale.

Per l'analisi canonica discriminante si è utilizzata la procedura SAS CANDISC per l'ottenimento di nuove variabili indipendenti, date dalla combinazione dei parametri analizzati.

2.4 Esperimento 2

Il latte utilizzato per le determinazioni descritte di seguito è stato quello prelevato a 7, 14 e 21 giorni post partum da 17 delle 45 vacche.

I campioni di latte sono stati classificati nuovamente in base al numero di cellule somatiche, ma avendo un numero inferiore di bovine, sono stati divisi in 2 gruppi:

High= $SCC > 100 \times 10^3$ cells/ml

Low= $SCC \leq 100 \times 10^3$ cells/ml

conservando il gruppo delle vacche con mammelle presubilmente sane (Low) e considerando tutte le altre ($SCC > 100 \times 10^3$ cells/ml) con mammelle con presunta infiammazione in corso.

2.4.1 Analisi dei metaboliti

I campioni di latte della mattina venivano portati rapidamente a laboratorio e congelati a -20°C fino al momento della spedizione in Danimarca.

I metaboliti quantificati sono stati i seguenti: β -idrossi butirrato, isocitrato, urea, acido urico, glucosio libero e fosfato, LDH e NAGasi.

L'isocitrato è stato analizzato con il metodo fluorimetrico (Larsen, 2014): il latte veniva portato a pH 10 con NaOH, riscaldato a 96°C per 20 min, fatto reagire con un enzima per la conversione a 2-ossigluterato per 3 min a Tamb. Successivamente veniva incubato con un fluoroforo per altri 6 min e l'emissione letta a 590 nm.

Il glucosio libero e quello fosfato sono stati determinati mediante metodi enzimatici-fluorometrici (Larsen, 2015), come il BHB (Larsen et Nielsen, 2010) e l'acido urico (Larsen et Moyes, 2010).

L'attività dell'LDH e dell'NAGasi sono state misurate con un fluorimetro (Chagunda et al., 2006).

L'urea è stata analizzata con il Foss Tecator.

2.4.2 Analisi d'espressione dei geni IL-8, SELL e GSN

Un'aliquota di latte della mungitura del mattino veniva rapidamente diluito 1:1 con PBS freddo, centrifugato 300g per 10 min a 4°C . Il pellet cellulare dopo essere stato lavato due volte, veniva risospeso in 1 mL di PBS 1X con 300ul di EDTA 0.5M a pH 8, ricentrifugato e l'RNA totale estratto mediante il Tri Reagent della Sigma. All'estratto veniva aggiunto della DNAsi e pulito con RneasyMinelute kit della Qiagen. Un'aliquota di RNA è stata utilizzata per la quantificazione ed il controllo di qualità del campione mediante elettroforesi capillare tramite Agilent 2100 Bioanalyzer

(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Ogni chip contiene dei microcanali interconnessi nei quali il campione di RNA viene separato nelle sue diverse specie, in base al loro peso molecolare mediante elettroforesi fluida. I frammenti di acido nucleico vengono rilevati grazie ad un fluorocromo intercalante e l'intensità di fluorescenza analizzata mediante il software 2100 Expert. Per ogni campione, si ottiene un elettroferogramma, dal quale si possono individuare le specie di RNA presenti, la concentrazione ($\text{ng}/\mu\text{L}$) riferita ad uno standard di pesi molecolari a concentrazione nota e il RIN (RNA Integrity Number), un indice qualitativo proporzionale all'integrità del campione stesso. Tale parametro cade in una scala che va da 10, per un RNA di ottima qualità, a zero per un RNA completamente degradato. Un ulteriore controllo di qualità viene effettuato mediante spettrofotometro (NanoPhotometer, Pearl, Implen) con lettura dell'assorbanza del campione a 260 nm (per acidi nucleici), 280 nm (per proteine), 230 nm (per composti organici quali fenoli, o residui di estrazione). Dal rapporto dei valori di densità ottica ottenuti dalle diverse assorbanze si può capire se il campione è contaminato da proteine o solventi organici che potrebbero interferire con le reazioni di retrotrascrizione per gli esperimenti di espressione genica. Per un campione di RNA non contaminato, il rapporto A_{260}/A_{280} deve essere compreso tra 1.8 e 2.1 mentre quello A_{260}/A_{230} deve essere superiore a 2. Successivamente il filamento del cDNA è stato retrotrascritto usando il Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Fermentas) secondo le istruzioni del produttore. I controlli negativi della reazioni di sintesi del cDNA sono stati condotti in assenza di trascrittasi inversa e utilizzati come modello in PCR per verificare l'assenza di contaminazione del DNA genomico per ogni campione. Il risultante cDNA è stato diluito in acqua DEPC. Le coppie di primers sono state disegnate mediante il software primer3 plus e verificate con la determinazione dell'efficacia di amplificazione di cinque diluizioni seriali del cDNA. L'efficienza di amplificazione dei 'normal genes' e dei 3 geni è riportata in tabella 4. La Real-time PCR è stata eseguita su 20 μl contenenti 20 ng di cDNA, utilizzando SYBR®Green PCR Master Mix in una StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystem). I cicli di PCR consistevano in una fase di denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti seguiti da 40 cicli di denaturazione a 95°C per 30 secondi ed una fase di appaiamento-estensione di primer a 60 °C per 1 min, in cui è stata misurata la fluorescenza. La curva di melting è stata prodotta dopo il completamento del programma termico di PCR per verificare la presenza di un picco gene-specifico e l'assenza di dimeri di primer. L'analisi RT-PCR dei campioni di cDNA è stata fatta in triplicato; i campioni non trascritti e non amplificati sono stati utilizzati come controlli. L'analisi geNormapplus è stata utilizzata per definire il numero e quali reference genes fossero idonei. I livelli di espressione relativi sono stati determinati utilizzando il software qBaseplus basato sul metodo implementato della $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

2.4.3 Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza usando la procedura GLM del SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC; release 9.1). Prima dell'analisi si è proceduto alla verifica della normalità della distribuzione di ciascun parametro mediante il test di Shapiro Wilks e, quando necessario, alla normalizzazione dei dati mediante trasformazione logaritmica. Il modello ha incluso fattori fissi quali: ordine di lattazione (P, 3 livelli: primipare, secondipare e pluripare), stagione di parto (S, 2 livelli: primavera e inverno), giorni dal parto (C, 3 livelli: 7, 14 e 21 d) e livello di SCC (H, 2 livelli: High e Low). La quantità di latte prodotta al controllo dal singolo animale (MY) è inserita come covariata.

Il modello statistico utilizzato è risultato il seguente:

$$Y_{ijklm} = \mu + P_i + S_j + C_k + H_l + \beta(MY)_{ijklm} + e_{ijklm}$$

in cui: Y_{ijklm} è la variabile dipendente, μ è la media generale, P_i è l'effetto dell' i -esima lattazione, S_j è l'effetto della j -esima stagione di parto, C_k è l'effetto del k -esimo controllo, H_l è l'effetto del l -esimo livello di SCC, $\beta(MY)_{ijklm}$ è l'effetto di regressione della quantità di latte al controllo ed e_{ijklm} è l'errore casuale.

Sono state calcolate le Correlazioni di Pearson con la procedura SAS PROC CORR per generare i coefficienti tra tutti i parametri analizzati nel latte e l'espressione genica delle cellule somatiche.

Tabella 4. Primers dei normal genes e dei tre geni in esame

Gene	Sequenza dei primers	nM	T ann (°C)	Amplicon (bp)	Efficienza (%)
ATP5B	Fw 5' TTTGGACTCCACGTCTCGCATC 3' Rw 5' TCCTGGAGGGATTTGTAGTCCTG 3'	200 200	61	108	100
EIF2B2	Fw 5' CCGTTCCCATTATGCTCAACTCCA3' Rw 5' TCCGTTGTCCCTTCCAGTTCCAC3'	200 100	61	81	101
SDHA	Fw 5' ACGATTACTCCAAGCCCATCCAG3' Rw 5' AACGTAGGAGAGCGTGTGCTTC3'	200 100	61	80	97
UXT	Fw 5' CATTGAGCGACTCCAGGAAG3' Rw 5' Fw CATTGAGCGACTCCAGGAAG3'	300 300	58	101	97
RPS9	Fw 5' CCTCGACCAAGAGCTGAAC3' Rw 5' CCTCCAGACCTCACGTTTGTTC3'	200 200	58	54	102
MRPS15	Fw 5' GCAGCTTATGAGCAAGGTCGT3' Rw 5' GTCATCAGCAGATAGCGCTT3'	300 300	58	151	100
B2M	Fw 5' GGGATCGAGACCTGTAAGCA3' Rw 5' CTGCCTAGGAAGGTCAAACA3'	300 200	58	208	90
PPIA	Fw 5' GGATTTATGTGCCAGGGTGGTGA3' Rw 5' ATGCCAGGACCTGTATGCTTCAA3'	300 200	60	116	97
YWHAZ	Fw 5' TGATGACAAGAAAGGGATTGTGG3' Rw 5' GTTCAGCAATGGCTTCATCA3'	200 200	55	203	103
CD62L	Fw 5' AGAGGAACAAAGACTCGGGG3' Rw 5' CCCAAATCACAGTTGCAGGT3'	100 100	57	154	100
IL8	Fw 5' CATTCCACACCTTCCACCC3' Rw 5' CCTTCTGCACCCACTTTTCC3'	100 100	59	145	94
GSN	Fw 5' CCGCGTGCACGTTTCC3' Rw 5' TCCTTGGCTGTGTCCTCAGT3'	300 300	57	102	101

3 RISULTATI

3.1 Esperimento 1

Nella sperimentazione effettuata sulle 45 vacche, il valore medio dei parametri analizzati nei quattro diversi controlli post partum nei tre gruppi High= $SCC \geq 500 \times 10^3$ cells/ml, Medium= $100 \times 10^3 < SCC < 500 \times 10^3$ cells/ml e Low= $SCC \leq 100 \times 10^3$ cells/ml è riportato nelle tabelle che seguono.

Gli acidi grassi sono stati identificati, mediante analisi spettroscopica, sia singolarmente sia in classi (Tabella 5). Tali classi sono state determinate in base alla:

- assenza/presenza e numero di insaturazioni in saturi (SFA), monoinsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA);
- lunghezza della catena alchilica in corti, da C4 a C10 (SCFA); medi da C12 a C 16:1 (MCFA); lunghi, da C17 (LCFA);
- posizione del doppio legame rispetto al gruppo carbossilico in $\omega 3$ e $\omega 6$.

I valori sono stati espressi in g/100mL di latte.

Tabella 5. Profilo acidico (gli acidi riportati in tabella sono espressi in g/100mL di latte).

	High	Medium	Low	RPDcv
% di grasso	4.33 ± 0,20	4,43 ± 0,16	4,25 ± 0,13	132,99
C4	0.131 ± 0.003 ^a	0.123 ± 0.002 ^b	0.127 ± 0.002 ^{ab}	3,67
C6	0.067 ± 0.002	0.067 ± 0.001	0.066 ± 0.001	3,32
C8	0.036 ± 0.001	0.038 ± 0.001	0.036 ± 0.001	3,29
C10	0.057 ± 0.006	0.066 ± 0.005	0.059 ± 0.004	3,37
C12	0.068 ± 0.008	0.078 ± 0.006	0.071 ± 0.005	3,62
C14	0.359 ± 0.015	0.370 ± 0.012	0.356 ± 0.010	3,88
C14:1 cis	0.028 ± 0.001	0.030 ± 0.001	0.029 ± 0.001	1,78
C16	1.324 ± 0.036 ^a	1.277 ± 0.02 ^{ab}	1.227 ± 0.023 ^b	4,18
C16:1 cis	0.087 ± 0.003	0.087 ± 0.002	0.089 ± 0.002	1,91
C17	0.031 ± 0.0005	0.031 ± 0.0004	0.031 ± 0.0003	2,24
C18	0.508 ± 0.013	0.513 ± 0.010	0.522 ± 0.008	2,51
totC18_1trans	0.125 ± 0.008	0.131 ± 0.006	0.138 ± 0.005	2,17
C18_1cis9	1.090 ± 0.045	1.093 ± 0.035	1.160 ± 0.029	4,35
Tot C18_1cis	1.158 ± 0.048	1.166 ± 0.037	1.235 ± 0.031	4,58
Tot C18_2	0.100 ± 0.003	0.105 ± 0.002	0.105 ± 0.002	1,79
C18_2 c9c12	0.074 ± 0.003	0.077 ± 0.002	0.075 ± 0.002	1,91
C18_3 c9c12c15	0.021 ± 0.001	0.022 ± 0.0008	0.022 ± 0.0007	1,77
C18_2 c9t11	0.023 ± 0.002 ^a	0.018 ± 0.002 ^b	0.023 ± 0.001 ^a	1,95
SFA	2.784 ± 0.050 ^A	2.763 ± 0.039 ^{AB}	2.683 ± 0.032 ^B	10,22
MUFA	1.400 ± 0.050	1.419 ± 0.032	1.484 ± 0.032	5,83
PUFA	0.166 ± 0.006	0.167 ± 0.004	0.167 ± 0.004	2,10
SCFA	0.301 ± 0.011	0.306 ± 0.008	0.301 ± 0.007	3,88
MCFA	1.918 ± 0.052	1.903 ± 0.040	1.846 ± 0.033	5,53
LCFA	2.061 ± 0.062	2.080 ± 0.048	2.156 ± 0.040	4,52
ISO+ANTEISO	0.074 ± 0.002 ^b	0.077 ± 0.002 ^b	0.081 ± 0.001 ^a	2,00
ω3	0.027 ± 0.001	0.028 ± 0.001	0.028 ± 0.001	1,73
ω6	0.100 ± 0.004	0.106 ± 0.003	0.101 ± 0.003	1,90

^{a, b} P<0.05; ^{A, B} P<0.10; RDPcv: ratio performance/deviation of cross validation

L'analisi statistica degli acidi grassi in esame nei 3 gruppi di bovine ha mostrato una differenza significativa fra i 3 gruppi per l'acido butirrico (C4:0) e per l'acido palmitico (C16:0), che diminuiscono entrambi al diminuire delle cellule somatiche. Per il primo c'è differenza tra High (0.131) e Medium (0.123) con una $P = 0.03$, mentre per il secondo acido tra High e Low (1.324 vs 1.227) con $P = 0.02$. L'acido linoleico coniugato (CLA) presenta una diminuzione uguale tra High e Medium (0.023 vs 0.018) con $P = 0.07$ e un innalzamento nei Low rispetto ai Medium (0.018 vs 0.023) con $P = 0.04$. Se consideriamo le classi degli acidi, i saturi mostrano una tendenza alla diminuzione al diminuire della SCC: High > Medium $P = 0.08$; Medium > Low $P = 0.08$.

Gli acidi grassi ramificati sono acidi la cui struttura presenta dei gruppi alchilici laterali. A seconda che tali gruppi siano posti in corrispondenza del secondo o del terzo atomo di carbonio ω , vengono definiti rispettivamente acidi grassi ramificati iso ed anteiso. Con la spettroscopia MIR si determinano insieme e i risultati mostrano come il gruppo dei Low presenti un valore maggiore (0.081) rispetto sia agli High (0.074 con $P = 0.01$) che ai Medium (0.077 con $P = 0.03$).

Tutti gli altri acidi, classi comprese, non hanno evidenziato alcuna differenza significativa.

Nella Tabella 6 sono riportati i valori dei minerali analizzati nel latte individuale nei 4 controlli [sodio (Na), calcio (Ca), fosforo (P), magnesio (Mg) e potassio (K)] insieme ai tre parametri metabolici utilizzati tradizionalmente per valutare lo stato di salute dell'animale (BHB, acetone e citrati).

In sintesi, i cinque minerali hanno presentato concentrazioni medie dei 4 controlli significativamente diverse nei 3 gruppi, anche se Ca e P mostrano solo una tendenza, mentre i metaboliti presi in considerazione non hanno presentato alcuna differenza significativa.

Tabella 6. Contenuto del latte in minerali e metaboliti.

	High	Medium	Low	RDPcv
BHB mM	0.190 ± 0,016	0.171 ± 0,011	0.194 ± 0.009	2.36
Acetone mM	0.110 ± 0.014	0.099 ± 0.010	0.110 ± 0.009	2.03
Citrati mM	8.465 ± 0.453	7.704 ± 0.321	7.922 ± 0.274	2.96
Na mg/kg	446.7 ± 9.4 ^a	398.2 ± 7.1 ^b	392.1 ± 5.9 ^b	1,48
Ca mg/kg	1108 ± 22 ^A	1085 ± 16 ^{AB}	1067 ± 14 ^B	1,34
P mg/kg	975.0 ± 21.4 ^A	955.9 ± 16.1 ^{AB}	932.9 ± 13.5 ^B	2,34
Mg mg/kg	97.7 ± 2.2 ^a	92.5 ± 1.7 ^b	92.1 ± 1.4 ^b	1,99
K mg/kg	1616 ± 23 ^a	1515 ± 17 ^b	1518 ± 15 ^b	1,88

a, b P<0.05; A, B P<0.10

RDPcv: ratio performance/deviation of cross validation

Lo studio del profilo della N-glicosilazione dell'IgG effettuato con l'ULPC con marcatura fluorescente ha evidenziato la struttura di 19 differenti glicani (Figura 10 e Tabella 7).

Figura 10. Profilo della N-glicosilazione dell'IgG (cromatogrammi sovrapposti di differenti singoli campioni di latte, ogni picco corrisponde ad una diversa struttura).

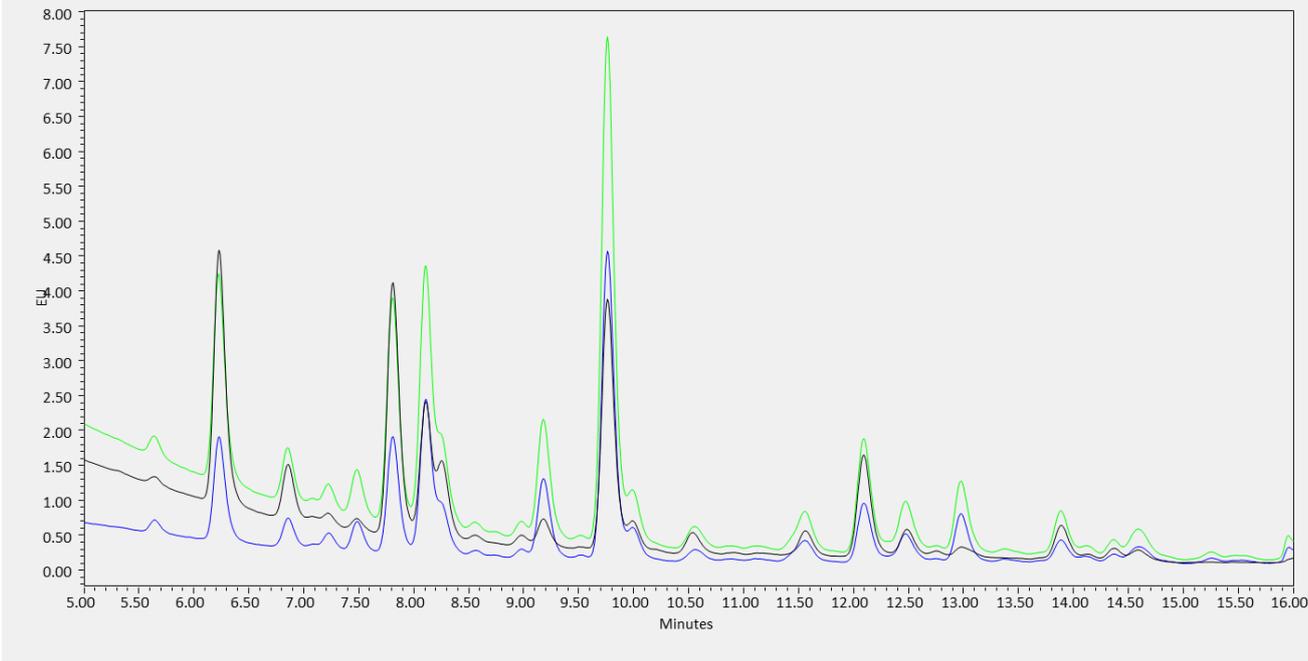


Tabella 7. Glicani identificati.

	High	Medium	Low
GP1	1.538 ± 0.117	1.725 ± 0.089	1.675 ± 0.073
GP2	7.604 ± 0.164 ^{ab}	8.206 ± 0.253 ^a	7.455 ± 0.208 ^b
GP3	2.169 ± 0.164	2.229 ± 0.125	2.079 ± 0.102
GP4	2.302 ± 0.112 ^b	2.367 ± 0.085 ^B	2.566 ± 0.070 ^{aA}
GP5	3.079 ± 0.176 ^B	3.205 ± 0.134 ^{AB}	3.439 ± 0.110 ^A
GP6	8.114 ± 0.238 ^B	8.590 ± 0.181 ^A	8.248 ± 0.238 ^{AB}
GP7	17.26 ± 0.58 ^{AB}	17.32 ± 0.44 ^A	16.34 ± 0.36 ^B
GP8	0.838 ± 0.058	0.850 ± 0.044	0.785 ± 0.036
GP9	8.665 ± 0.479 ^B	8.347 ± 0.365 ^b	9.644 ± 0.299 ^{aA}
GP10	30.522 ± 0.710	29.637 ± 0.541	30.036 ± 0.444
GP11	0.526 ± 0.076	0.508 ± 0.058	0.492 ± 0.047
GP12	0.713 ± 0.065	0.750 ± 0.050	0.7932 ± 0.041
GP13	1.823 ± 0.173	1.825 ± 0.132	1.710 ± 0.108
GP14	2.254 ± 0.287	1.737 ± 0.218	1.721 ± 0.179
GP15	2.505 ± 0.129	2.461 ± 0.098	2.659 ± 0.080
GP16	4.746 ± 0.188	4.881 ± 0.143	5.100 ± 0.117
GP17	1.628 ± 0.130	1.605 ± 0.099	1.575 ± 0.081
GP18	2.388 ± 0.165	2.393 ± 0.126	2.297 ± 0.103
GP19	1.325 ± 0.092	1.361 ± 0.070	1.382 ± 0.058

a, b P<0.05; A, B P<0.10

Tra i glicani, il GP4 e il GP5 mostrano un andamento inverso rispetto alla SCC con differenze significative tra gruppi. IL GP2 e il GP7 evidenziano una concentrazione maggiore nelle Medium, in modo significativo rispetto alle Low, come anche il GP6, ma quest'ultimo rispetto alle High.

Al fine di identificare possibili biomarkers tra tutti i 55 parametri precedentemente illustrati si è proceduto con un'analisi canonica discriminante, avendo precedentemente classificato gli animali in 3 gruppi in base al contenuto di SCC nel latte (High, Medium, Low).

L'analisi canonica è un approccio multivariato che permette di ottenere delle combinazioni lineari dei parametri quantitativi misurati, definite come funzioni canoniche, le quali riassumono al meglio le differenze tra i tre gruppi precedentemente definiti, massimizzando le differenze fra il loro valore medio lungo gli assi canonici, che ci consente di apprezzare la dispersione fra i 3 gruppi nel piano cartesiano definito da queste nuove indipendenti funzioni.

La procedura multivariata utilizzata ha mostrato innanzitutto che in funzione di tutti i parametri fenotipici misurati e dei rispettivi rapporti di varianza e covarianza, sono sufficienti 2 nuove variabili: canonica 1 (Can1) e canonica 2 (Can2) per spiegare il 100% della variabilità presente fra le medie dei tre gruppi: la canonica 1 assorbe il 64% della dispersione fra i gruppi con una probabilità altamente significatività ($P < 0,0001$); mentre la canonica 2 assorbe il rimanente 36% con una significativa probabilità ($P < 0,05$).

Dalla struttura canonica totale si evidenziano tutti i coefficienti dei parametri analizzati nelle due variabili canoniche ottenute, ossia il peso che ogni parametro ha sulla singola variabile canonica. Nella Tabella 8 si riportano solo i coefficienti più significativi dei parametri analizzati, tralasciando tutti quelli al di sotto di 0.3.

Tabella 8. Struttura canonica totale: coefficienti dei parametri considerati (>0.3)

Parametri	Can 1	Can 2
Grasso	-0.06	-0.38
C 16	0.10	-0.41
C18:2 c9c12	-0.09	-0.39
SFA	0.02	-0.38
MCFA	0.05	-0.38
$\omega 6$	-0.07	-0.40
Na	0.52	0.07
K	0.39	0.05
GP2	0.06	-0.46
GP9	-0.14	0.46

Sono state poi determinate le coordinate dei centroidi delle due funzioni canoniche, che è dato, per ogni gruppo di animali, dalle medie di tutti i singoli caratteri fenotipici studiati:

	Can1	Can2
High	3.28	1.12
Medium	0.21	-1.64
Low	-1.26	0.79

Nella Figura 11 si illustra la distribuzione delle due canoniche.

Mediante la Can1 si evidenzia una netta separazione tra il gruppo Low e High, mentre le Medium si sovrappongono in parte sia con l'uno che con l'altro gruppo. Invece, grazie alla Can2, le Medium si contraddistinguono chiaramente dalle altre due.

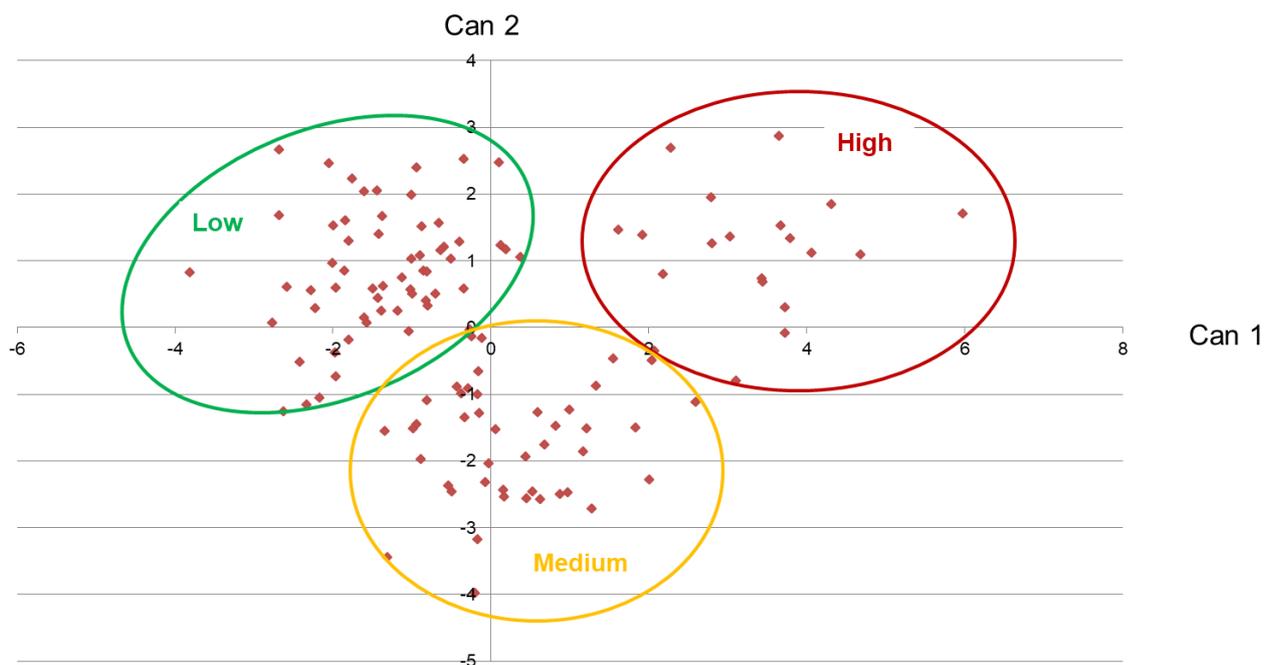


Figura 11. Distribuzione dei singoli campioni di latte

3.2 Esperimento 2

Nella seconda sperimentazione sono state scelte 17 bovine delle 45 totali e in occasione di tre controlli post partum sono stati determinati la produzione di latte e il contenuto di grasso, proteine, lattosio come anche il numero di cellule somatiche per valutare la qualità del latte (vedi Tabella 9). Nei 3 controlli è stata rilevata una differenza significativa nella produzione di latte (21,6; 24,2; 26,3 Kg/d) e nella concentrazione del lattosio (4.42; 4.64; 4.83 g/100mL), che aumentano all'aumentare della distanza dal parto ($P < 0.05$). Sono stati poi analizzati alcuni parametri tradizionalmente utilizzati per stabilire lo stato di salute delle vacche: glucosio, G6P, BHB, urea, isocitrato e acido urico. Anche i due tipi di glucosio variano in modo significativo ($P < 0.05$), il glucosio libero aumenta (0.13; 0.17; 0.22 mM) mentre quello fosfato decresce (0.27; 0.20; 0.18 mM) sempre con il passare dei giorni. La concentrazione di isocitrato ha un andamento inverso, diminuisce con l'aumento dei giorni. Infine per valutare l'eventuale presenza di IMI sono stati quantificati due enzimi, la NAGasi e l'LDH. Gli altri parametri non presentano differenze significative tra i controlli, tranne nel caso della NAGasi: la sua quantità diminuisce tra 7 e 14 giorni pp (3.23; 1.79 U/L $P < 0.05$) per poi riaumentare a 21gg (2.10 U/L).

Effettuando la classificazione degli animali in 2 gruppi, ad alto contenuto di cellule somatiche (High, $SCC > 100\ 000$ cell/mL) e a basso contenuto (Low, $SCC \leq 100\ 000$ cell/mL) sono state osservate le medie dei suddetti parametri ed evidenziate le differenze significative. Il grasso è maggiore del gruppo High (4.20 vs 3.79 g/100mL, $P = 0.035$) mentre il lattosio è minore (4.54; 4.71 g/100mL, $P = 0.036$) come anche il glucosio libero (0.15; 0.20mM, $P = 0.003$). I due marker enzimatici di IMI mostrano entrambi naturalmente un aumento significativo ($P = 0.001$) all'aumentare della SCC (3.19 vs 1.55 U/L per NAGasi e 6.20 vs 1.97 U/L per LDH). Gli altri parametri non mostrano invece differenze significative.

Nel presente esperimento (Tabella 10) il grasso è correlato ($P < 0.05$) negativamente con il lattosio (-0.66) e il glucosio (-0.48) e positivamente, sempre con $P < 0.05$, con il G6P (0.56), l'isocitrato (0.36) e i due enzimi (LDH 0.49, NAGasi 0.29). Il lattosio mostra un coefficiente significativo di 0.64 con il glucosio e di -0.43 e -0.50 rispettivamente con NAGasi e LDH. Le due forma di glucosio sono naturalmente correlate tra loro in modo negativo, ed essendo la forma libera positivamente legata alla LDH e alla NAGasi, la forma fosfato lo è in modo negativo. L'isocitrato è correlato negativamente con lo stadio di lattazione (-0.52) con una $P < 0.05$. La concentrazione di urea è invece debolmente correlata con lo stadio di lattazione e le proteine (-0.25 con $P < 0.10$). Una

moderata correlazione negativa tra glucosio libero e SCC (-0.37, P <0.05), e infine una positiva tra acido urico e glucosio (0.29, P <0.05) e contenuto proteico (0.25, P< 0.10).

Tabella 9. Parametri qualitativi e metabolici del latte

	N	Means \pm SE	Controlli			Gruppi	
			7 g	14 g	21 g	High	Low
Latte (Kg/d)	48	26.6 \pm 6.5	21.6 ^b	24.2	26.3 ^a	23.8	24.3
Grasse (g/100mL)	48	4.09 \pm 0.63	4.23	3.83	3.93	4.20 ^a	3.79 ^b
Proteine (g/100mL)	48	3.05 \pm 0.32	3.12	2.94	2.91	3.05	2.93
Lattosio (g/100mL)	29	4.54 \pm 0.19	4.42 ^c	4.64 ^b	4.83 ^a	4.54 ^b	4.71 ^a
SCC (log10 n ^o /mL)	48	2.31 \pm 0.39	2.15	2.11	2.12	2.61 ^a	1.64 ^b
Glu6P (mM)	48	0.26 \pm 0.10	0.27 ^a	0.20 ^b	0.18 ^b	0.24	0.20
Glucosio (mM)	48	0.16 \pm 0.05	0.13 ^c	0.17 ^b	0.22 ^a	0.15 ^b	0.20 ^a
BHB (ln mM)	48	5.77 \pm 1.09	6.18	5.80	5.76	5.87	5.96
Isoc (mM)	48	0.17 \pm 0.04	0.21 ^a	0.17 ^b	0.16 ^b	0.18	0.18
Urea (mM)	48	3.13 \pm 0.92	3.30	3.04	2.78	3.04	3.04
NAGasi (U/L)	48	3.18 \pm 1.63	3.23 ^a	1.79 ^b	2.10 ^{ab}	3.19 ^a	1.55 ^b
LDH (U/L)	48	5.24 \pm 3.75	5.05	4.08	3.12	6.20 ^a	1.97 ^b
Acido urico (mM)	48	197 \pm 56	200	202	213	198	212

Le differenti lettere rappresentano la differenza significativa tra le medie dei 3 controlli e tra i due gruppi ad alta SCC e a bassa SCC. **a, b (P< 0.05).**

Tabella 10. Coefficienti di Pearson tra i parametri analizzati

	GSN	IL-8	DIM	latte	grasso	prot	lattos	SCC	G6P	glu	BHB	isoc	urea	NAGasi	LDH	a.u.
SELL	0.71	0.78	-0.06	<u>0.27</u>	-0.07	0.12	-0.24	0.59	-0.03	-0.09	0.07	0.03	0.05	0.37	0.20	-0.20
GSN		0.62	-0.15	0.11	0.11	0.38	<u>0.33</u>	0.68	0.18	<u>-0.27</u>	-0.06	-0.04	-0.06	0.62	0.46	-0.03
IL-8			-0.06	0.32	-0.12	-0.08	-0.09	0.60	-0.12	-0.17	0.12	-0.01	-0.01	0.32	0.19	-0.35
DIM				0.19	-0.28	-0.43	0.52	-0.08	-0.51	0.53	-0.14	-0.52	<u>-0.25</u>	-0.31	<u>-0.24</u>	0.07
latte					-0.60	-0.44	0.37	0.02	-0.44	0.53	0.10	-0.12	0.24	-0.19	-0.19	0.02
grasso						0.33	-0.66	0.20	0.56	-0.48	0.12	0.36	0.12	0.29	0.49	-0.06
prot							<u>-0.35</u>	0.30	0.75	-0.41	0.05	0.18	<u>-0.25</u>	0.55	0.42	<u>0.25</u>
lattos								-0.08	<u>-0.33</u>	0.64	0.14	<u>-0.33</u>	-0.21	-0.43	-0.50	0.23
SCC									0.32	-0.37	-0.10	-0.03	0.01	0.68	0.52	-0.18
G6P										-0.54	0.07	0.34	-0.04	0.62	0.46	0.14
glu											0.04	-0.17	-0.02	-0.60	-0.40	0.29
BHB												<u>0.27</u>	-0.14	-0.22	0.07	0.14
isoc													<u>0.25</u>	0.11	0.17	-0.06
urea														-0.06	0.09	-0.13
NAGasi															0.42	-0.20
LDH																-0.14

DIM: days in milk, giorni di lattazione

prot: proteine

lattos: lattosio

glu: glucosio

a. u. : acido urico

isoc: isocitrato

Grassetto: $P < 0.05$; Corsivo sottolineato: $P < 0.10$

Sulle cellule somatiche ottenute dal latte per centrifugazione, è stata valutata l'espressione dei tre geni: IL-8, SELL e GSN.

Per normalizzare i dati della qRT-PCR è importante selezionare uno o più geni di riferimento con un'espressione stabile. L'uso di un *normal gene* valido aiuta a correggere variazioni aspecifiche, come le differenze nella quantità e quantità di RNA o cDNA, che possono influenzare l'efficienza della reazione di PCR. Diversi report sono stati pubblicati negli Stati Uniti sulla variazione di "apparenti" normal gene (Schmittgen e Zakrajsek, 2000, Selvey et al., 2001). Inoltre, è stato dimostrato che utilizzando una normalizzazione con un singolo *housekeeping*, si possono effettuare errori sul calcolo dell'espressione dei geni in esame fino a 20 volte (Vandesompele et al., 2002). Di conseguenza, si ritiene che un singolo gene di riferimento sia insufficiente e si raccomanda che i potenziali geni di riferimento siano convalidati per la stabilità attraverso le specifiche condizioni dell'esperimento. In questo esperimento è stato valutato un panel di 9 possibili normal genes, vedi tabella 4, e ne sono stati prescelti solamente due tramite un software idoneo (geNorm), in grado di verificarne l'effettiva stabilità. La normalizzazione dei dati RT-PCR è stata quindi effettuata contro ATP5B (ATP synthase subunit) e SDHA (Succinate dehydrogenase complex, subunit A).

Mediante l'analisi statistica si è evidenziata come l'espressione di tutti e tre i geni aumenti in modo significativo nel gruppo delle High con $P < 0.0001$, ma non tra i tre tempi di controllo (vedi Tabella 11). IL-8 High 2.72 vs Low 1.97, SELL High 2.35 vs Low 1.73 e GSN High 3.55 vs Low 2.53.

Tabella 11. Espressione genica di SELL, IL-8 e GSN

	N	Means \pm SE	Controlli			Gruppi		
			7 g	14 g	21 g	High	Low	P valore
SELL	48	2.34 \pm 0.61	2.43	2.32	2.28	2.72	1.97	< 0.0001
GSN	48	2.11 \pm 0.37	2.16	1.98	1.98	2.35	1.73	< 0.0001
IL8	48	3.10 \pm 0.69	3.17	3.11	2.85	3.55	2.53	< 0.0001

In tabella 10 lo studio dei coefficienti di Pearson ha evidenziato soprattutto una forte e significativa correlazione dell'espressione dei tre geni stessi, buona con SCC e NAGasi ($P < 0.05$). Solo il gene della GSN è correlata significativamente anche con la LDH (0.46, $P < 0.05$).

4 DISCUSSIONE

E' indubbio che, nonostante i notevoli e recenti sforzi finalizzati a migliorare la gestione della fase di transizione della lattifera a elevata potenzialità produttiva, i risultati non sono ancora da ritenersi del tutto soddisfacenti. La bovina fatica ad adattarsi fisiologicamente alla rapida crescita del feto, al parto e alla grande richiesta di energia per la lattogenesi, con un risentimento che interessa anche il metabolismo dei nutrienti. L'animale va incontro ad un bilancio energetico negativo e l'aumentata richiesta di nutrienti viene soddisfatta dal ricorso alle riserve energetiche del tessuto adiposo, con la conseguente lipomobilizzazione e aumento dei NEFA nel flusso ematico. Se il rilascio è limitato a concentrazioni tali che possano essere metabolizzate rapidamente per i bisogni energetici, associati alla glucogenesi, la vacca riesce ad adattarsi, altrimenti i NEFA si accumulano nel fegato, dove sono processati in vari modi: ossidati per produrre energia, riconvertiti in trigliceridi e conservati negli epatociti o infine convertiti in corpi chetonici. Un ciclo deleterio di dislipidemia porta a una compromissione delle funzioni del fegato, riduce la glucogenesi ed aumenta la richiesta di lipolisi (Sordillo and Mavangira, 2014).

Se prima si presupponeva che esistesse solo un collegamento tra dislipidemia e malattie metaboliche (Oetzel, 2004) ora si pensa che esista una correlazione tra *pathways* metabolici ed immunologici, che contribuiscono in modo sinergico alla patogenesi di malattie metaboliche e infettive (Sordillo and Raphael, 2013).

La conferma è rappresentata dall'elevata frequenza di affezioni cliniche e subcliniche, metaboliche ed infettive, che si verificano nel periparto, con conseguenze gravi sia per lo stato di salute e il benessere delle bovine che per la sostenibilità economica degli allevamenti moderni.

Il primo passaggio che attiva la cascata infiammatoria durante un'infezione microbica, è il riconoscimento del patogeno invasore attraverso i recettori di riconoscimento presenti sulle cellule dell'ospite (Jungi et al., 2011). Tali recettori possono essere espressi sulla superficie cellulare, al loro interno come anche secreti dalle cellule con lo scopo di riconoscere una serie di fattori microbici associati al patogeno infettivo. Alcuni esempi di ricettori per il riconoscimento dei profili che possano differenziare un range di PAMP (pathogen-associated molecular patterns), trovati in cellule immunitarie e non, sono il CD14 e la famiglia dei toll like receptors, come il TLR2, il TLR4, TLR5 e il TLR9 (Kumar et al., 2011). Dopo essersi legato al proprio ligando, il recettore invia segnali intracellulari attraverso il rilascio di potenti fattori pro infiammatori, come l'ossido nitrico, ossilipidi e citochine. Questi mediatori possono a loro volta suscitare una risposta infiammatoria sistemica che include il rilascio di proteine di fase acuta dal fegato (Lumeng and Saltiel, 2011). Considerando proprio tali proteine insieme ad alcuni indicatori della funzionalità del fegato, Trevisi

et al. (2012) hanno definito un indice dell'attività epatica, relazionata sia alle malattie metaboliche sia a quelle infettive.

L'infiammazione dovrebbe essere un processo limitato che termina appena l'attacco viene neutralizzato e il tessuto sia stato riparato, anche se Serhan (2009) ha dimostrato che la risoluzione dell'infiammazione è fortemente controllata dal sistema immunitario ed orchestrata almeno in parte dai mediatori lipidici che mostrano un effetto anti infiammatorio e proprietà pro risolutive e protettive. Questa risoluzione tempestiva è essenziale per prevenire danni collaterali nei tessuti, provenienti infatti da una risposta immunitaria troppo prolungata e vigorosa.

La ricerca dei biomarcatori delle malattie è diventata un importante argomento di studio negli ultimi anni, in particolare grazie al continuo sviluppo tecnologico. I biomarcatori sono indicatori di processi e patologie biologiche che possono rivelare una varietà di tratti distintivi di salute e malattia (Biomarkers Definitions Working Group, 2001) e sono quindi degli analiti che possono essere utilizzati per prevedere il progresso e l'esito di una malattia.

Con questo studio si evidenzia come le attuali tecnologie, unitamente a una migliorata comprensione dei meccanismi fisio-patologici con cui si scatenano certe affezioni, possono consentire di monitorare con interesse e attenzione lo stato di salute delle bovine, permettendo l'individuazione in fase precoce di eventuali fenomeni patologici.

4.1 Esperimento 1

4.1.1 Minerali

Il contenuto in ceneri del latte bovino, che rappresenta l'insieme delle sostanze minerali in esso contenute, è pressoché costante, con un quantitativo che si aggira intorno al 0,7-0,8%. Il contenuto dei singoli ioni può invece variare considerevolmente nel colostro, nel latte di tarda lattazione o nel latte di animali con IMI. Perciò la variazione della loro concentrazione può essere utilizzata come un biomarker della salute della mammella. Nel presente studio tutti i minerali analizzati aumentano con la SCC, anche se non sempre in accordo con i dati in letteratura. In molti studi è stata dimostrata la relazione tra Na, Cl e K e l'insorgenza di malattie come la mastite (Hamann and Krömker, 1997; Summer et al., 2009). Nel nostro studio, in accordo con tali ricerche e con altri lavori (Kitchen, 1981; Peaker and Faulkner, 1983; Schultz, 1977) è stato osservato un innalzamento del sodio all'aumentare delle cellule somatiche. Infatti, dato che l'infezione batterica si traduce in un danneggiamento dell'epitelio del dotto e dell'epitelio secernente e in un aumento della permeabilità dei vasi sanguigni, il Na, che è lo ione più abbondante nel sangue, si riversa nel lume

degli alveoli, aumentando la sua concentrazione nel latte. I valori di K riportati nella Tabella 6 sono invece in contrasto con i dati in letteratura. Il sale più abbondante nel latte è proprio il potassio, il quale si disperde attraverso la via paracellulare durante un'infezione. Linn (1988) riporta un declino della sua concentrazione insieme al lattosio, entrambi per compensare l'aumento degli altri sali e mantenere così inalterato l'equilibrio osmotico del sistema mammario.

Kitchen, 1981 e Schultz, 1977 dimostrano che le percentuali di calcio e fosforo diminuiscono in presenza di IMI, probabilmente perché riflettono l'abbassamento dei valori delle caseine. Il calcio e il fosforo sono infatti ioni complessati dalle loro micelle. Il contenuto di queste proteine diminuisce per la maggiore attività proteolitica di enzimi idrolitici derivanti da batteri e dalle cellule stesse presenti nel latte infetto. Sul contenuto di magnesio ci sono dati contrastanti. Tallamy e Randolph (1970) ne riscontrano un lieve aumento.

Dall'analisi multivariata si evince che la canonica 1 sia rappresentata da due potenziali biomarkers da valutare contemporaneamente: il sodio ed il potassio (vedi tabella 6), come evidenziato anche da Bastin et al. (2016). Nel nostro studio sono in grado di differenziare nettamente le bovine con alto contenuto di cellule somatiche da quelle con SCC inferiore a 100000 cells/ mL (presumibilmente sane). Dato che la variazione della concentrazione dei minerali è una misura del danneggiamento delle cellule e non semplicemente una reazione all'invasione batterica, tali composti variano in presenza di una semplice infiammazione e non necessitano di un'infezione. Alcuni studi sull'uso della conducibilità, che ricordiamo indica la misura degli ioni Na e Cl nel latte, hanno verificato come tale misurazione sia poco affidabile perché è difficile definire un threshold che differenzi in modo netto il latte sano da quello infetto. Invece, studi che abbiano valutato la conducibilità come una possibile deviazione dalla baseline del singolo animale o di un'intera mandria, hanno dimostrato come questa possa rappresentare uno strumento utile per diagnosticare precocemente le infiammazioni intramammarie ed accorciarne conseguentemente i tempi di guarigione (Villarreal, 2017).

4.1.2 Profilo acidico

Gli acidi grassi del latte hanno due origini principali: la sintesi de novo nella ghiandola mammaria [che produce acidi grassi a corta catena (SCFA) e parte di quelli a media catena (MCFA)] e il trasporto nel circolo ematico di acidi grassi preformati che originano dai grassi presenti nella razione, dalla bioidrogenazione e degradazione batterica ruminale o dalla mobilizzazione del tessuto adiposo [che produce acidi grassi a lunga catena (LCFA) e la quota rimanente di (MCFA)] (Randolph HE. 1974).

In uno studio effettuato da Chipilev et al. (2017) su vacche sane e vacche affette da mastite subclinica è stato evidenziato nel latte infetto un aumento degli SFA dovuto principalmente agli SCFA e MCFA (C4:0–C16:0) che concorda con l'innalzamento del contenuto dell'acido butirrico e palmitico e del contenuto totale dei saturi all'aumentare della SCC determinato nella presente ricerca. Ochoa-Zarzosa et al. (2009) hanno dimostrato come il butirrato di sodio, una molecola con proprietà antimicrobiche e antinfiammatorie note, presente naturalmente nel latte bovino riduca fino al 50% l'internalizzazione dello *S. aureus* nelle cellule epiteliali della mammella e sia in grado di far sovraesprimere l'espressione di geni regolatori per peptidi antimicrobici. Tale molecola è quindi in grado di modulare l'immunità nella ghiandola mammaria e migliorare la difesa contro l'invasione batterica.

4.1.3 Acidi grassi dispari e ramificati

I principali acidi grassi dispari e quelli a catena ramificata (OBCFA) nel latte bovino sono isomeri dell'acido tridecanoico (iso C13: 0), acido tetradecanoico (iso C14: 0), acido pentadecanoico (C15: 0, C15 iso: 0 anteiso e C15: 0), acido esadecanoico (iso C16: 0) e acido margarico (C17: 0, iso C17: 0 e C17 anteiso: 0) e derivano principalmente dai batteri ruminali. Si può quindi dedurre che gli OBCFA riflettano la funzionalità del rumine (ad esempio, il pattern di fermentazione ruminale, incluso il metano, il flusso duodenale di proteine microbiche e l'acidosi). La formazione microbica di OBCFA è stata delineata da Vlaeminck et al. (2006). In sintesi, i grassi a catena dispari (C15: 0 e C17: 0) sono formati attraverso l'allungamento del propionato o del valerato, mentre i precursori degli acidi grassi a catena ramificata (iso C13: 0, iso C14: 0, iso C15: 0, iso C16: 0, iso-C17: 0, iso C18: 0, anteiso C13: 0, anteiso C15: 0, anteiso C17: 0) sono gli amminoacidi a catena ramificata (valina, leucina e isoleucina) e i loro corrispondenti acidi carbossilici ramificati a catena corta (acidi isobutirrico, isovalerico e 2-metil butirrico). Il profilo OBCFA dei batteri ruminali sembra essere largamente determinato dall'attività dell'acido grasso sintasi del microrganismo piuttosto che dalla disponibilità dei precursori (Vlaeminck et al., 2006). Quindi, la variazione nel profilo OBCFA che fuoriesce dal rumine dovrebbe riflettere i cambiamenti nell'abbondanza relativa di specifiche popolazioni batteriche piuttosto che da un'alterata sintesi degli acidi grassi. Infatti è stato dimostrato che proporzioni più elevate di acidi iso riflettono un arricchimento nei batteri cellulolitici, mentre un aumento dell'anteiso C15: 0 può indicare un arricchimento dei batteri che fermentano la pectina e lo zucchero (Vlaeminck et al., 2006, Bessa et al., 2009).

Gli OBCFA sono sintetizzati maggiormente nella membrana cellulare batterica e poi trasferiti nel latte, suggerendo una loro potenzialità come marcatori non invasivi della fermentazione del rumine

e più in generale come indicatori delle principali sostanze nutritive e delle emissioni dal ruminante (metano) ma d'altra parte, derivando anche da una sintesi endogena e/o dalla conversione di altri ramificati come anche da variazioni durante la mobilitazione dei lipidi tissutali all'inizio della lattazione, sono anch'essi dei possibili indicatori dello stato di salute della bovina.

Le Frisone in esame hanno mostrato un valore più alto degli OBCFA nel gruppo delle Low, in modo significativo con Medium e High (vedi Tabella 5), ma nessuna variazione nei metaboliti indicatori di dismetabolie (Tabella 6).

4.1.4 Acidi grassi e infiammazione

La possibilità che il progressivo aumento della concentrazione degli acidi grassi non esterificati (NEFA) nel sangue possa direttamente influenzare la risposta immunitaria è supportata da molte ricerche. In particolare, è stato osservato che acidi saturi, come il palmitico e lo stearico, insieme all'acido oleico, sono i principali grassi presenti nel sangue di vacche al periparto (Contreras et al., 2010; Douglas et al., 2007), mentre si registra una diminuzione degli $\omega 3$. Questi cambiamenti della composizione dei NEFA durante la transizione si riflettono sul contenuto lipidico del latte e delle cellule immunitarie (Contreras, 2010).

Una volta che questi vengono internalizzati dai leucociti e dalle cellule endoteliali, gli FA giocano un ruolo importante nei segnali intracellulari, regolando così la rilevanza e la durata dell'infiammazione. Nell'uomo alcuni acidi grassi saturi e i PUFA possono legarsi a particolari recettori nucleari (PPARs) come l' α -linolenico e il DHA e possono in questo modo far sotto esprimere le reazioni infiammatorie, mentre alcuni MCFA possono incrementare il segnale pro infiammatorio attraverso l'attivazione del nuclear factor kB (NFkB). Anche se tale fenomeno di correlazione non è stato studiato specificatamente anche nelle bovine da latte, è stata notata una variazione dei NEFA nel periodo del parto, che provocano una risposta pro infiammatoria (de Heredia et al., 2012). Il decorso infiammatorio è schematizzato in Figura 12.

E' anche evidenziato come il risultato di un fenomeno acuto possa portare alla risoluzione oppure a uno stato cronico. Ciò è condizionato da molti fattori, come la natura e l'intensità del danno e l'eccessiva reattività dell'ospite, influenzata a sua volta da fattori genetici e dall'alimentazione.

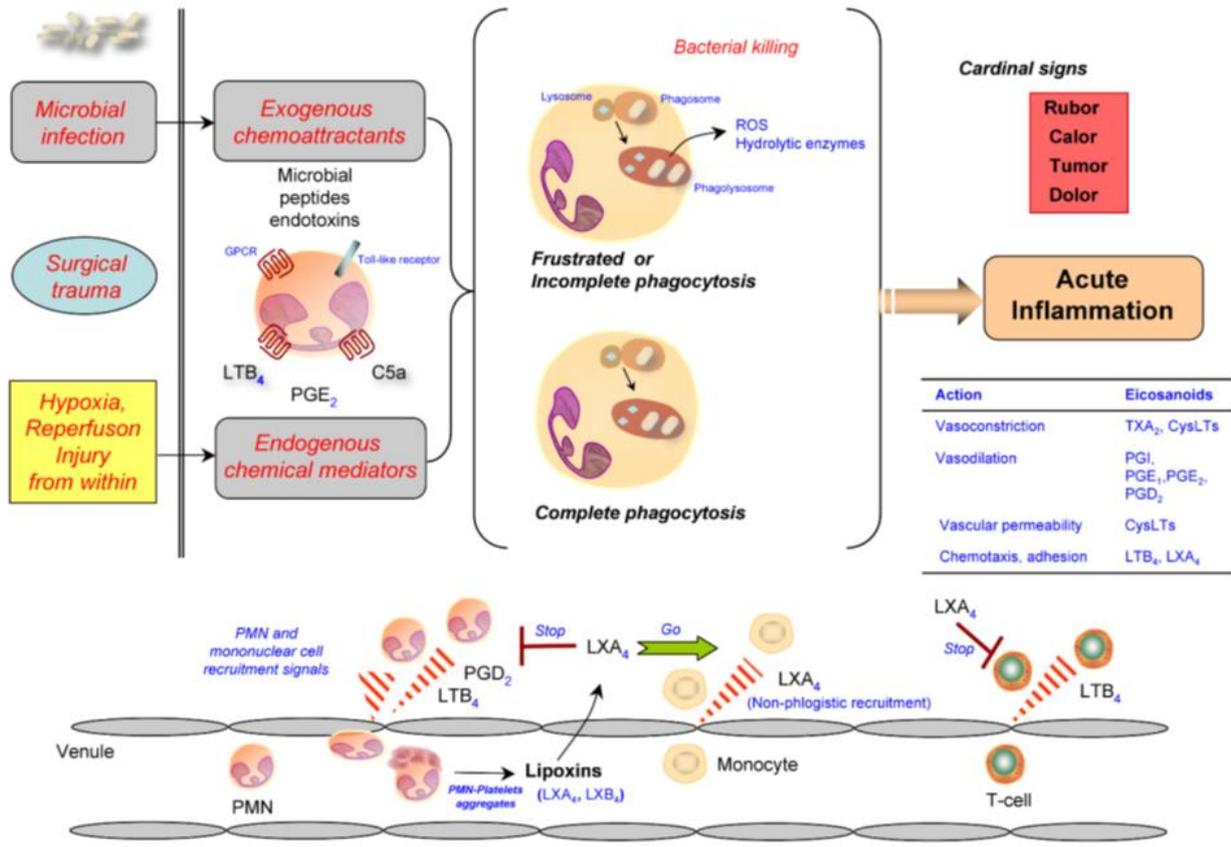
La canonica 2 presenta un numero superiore di parametri con coefficienti di valori molto simili, ad indicare come il gruppo delle Medium sia caratterizzato da un complesso più articolato di fattori legati al grasso e alla sua composizione, insieme anche a due glicani (GP2 GP9) (Tabella 7). Osservando l'insieme di parametri degli FA ed il valore intermedio di cellule somatiche, si può presupporre che il gruppo delle Medium sia relazionata o ad un iniziale fenomeno infiammatorio o

ad un fenomeno cronico. In precedenti studi è stato evidenziato come la presenza di acidi saturi, tra cui l'acido palmitico, possano attivare il NF- κ B, il quale porta all'attivazione della risposta innata dell'ospite (Sordillo et al., 2009). Infatti gli NF- κ B sono una famiglia di fattori di trascrizione che regolano l'espressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria e infiammatoria, nella proliferazione cellulare e nell'apoptosi (Baldwin, Jr., 1996; Barkett and Gilmore, 1999; Barnes and Karin, 1997; Gilmore, 1999). È noto che NF- κ B abbia un ruolo critico nell'attivazione dei geni coinvolti nell'infiammazione attraverso la via dei Toll like receptors, come anche che una loro prolungata attivazione sia associata a malattie risultanti da una stimolazione cronica della risposta immunitaria (Aggarwal et al., 2006; Makarov et al., 1997). Perciò, tali fattori trascrizionali mostrano un range molto ampio di potenziali funzioni, come la regolazione di geni che codificano per citochine e fattori di crescita, molecole di adesione, recettori di fase acuta e chemioattrattanti che influenzano il risultato della patologia (Schwartz et al., 1999). Le vie di segnale di NF- κ B attivate dai TLR portano in ultima analisi alla produzione di una serie di molecole proinfiammatorie come le interleuchine 1 β e 12, il TNF α ma anche la chemochina CXCL8 (IL-8), che è responsabile dell'attrazione dei neutrofili verso il sito infiammato. Quindi il C16:0 potrebbe mostrare un diretto legame con l'iniziale protezione contro i patogeni, prima che venga attivata l'immunità acquisita, ed essere considerato un possibile biomarker di infiammazione.

I NEFA ematici e la composizione dei fosfolipidi possono influenzare il segnale delle cellule immunitarie attraverso la produzione di una classe di mediatori lipidici, chiamati ossilipidi, che orchestrano la risposta immunitaria. Tali ossidi derivano dagli ω 6 e dagli ω 3, acidi polinsaturi presenti nei fosfolipidi che costituiscono le membrane cellulari (Raphael and Sordillo, 2013). Una volta che sono stati rilasciati dalla membrana, gli acidi vengono ossidati o per via enzimatica o mediante i ROS. L'acido arachidonico e l'acido linoleico, un suo precursore, sono solitamente il substrato dominante per la sintesi degli eicosanoidi, una famiglia di biocomposti che includono prostaglandine (PG), trombossani (TX), leucotrieni (LT) e acidi idrossieicosatetraenoici (HETE). L'acido arachidonico può essere mobilizzato da varie fosfolipasi, in particolare dalla fosfolipasi A2, e l'acido libero può successivamente reagire con gli enzimi della ciclossigenasi (COX) dando così origine alla serie 2 di PG e TX. La COX-2 è indotta nelle cellule infiammatorie come un risultato della stimolazione ed è responsabile per la produzione marcatamente elevata di PG che si verifica in seguito all'attivazione cellulare. I monociti e i macrofagi producono grandi quantità di PGE2 e PGF2 α , i neutrofili quantità moderate di PGE2 e i mastociti le PGD2. Il metabolismo dell'acido arachidonico mediante la 5-lipossigenasi (5-LOX) dà origine all'idrossi e all'idroperossido derivato (5-HETE e 5-HPETE, rispettivamente), e alle serie 4 LT, LTA4, B4, C4, D4 e E4. PGE2 presenta

un numero di effetti pro-infiammatori tra cui l'induzione della febbre, l'aumento della permeabilità vascolare e la vasodilatazione, e accresce il dolore e l'edema causato da altri agenti. Durante un'inflammatione acuta o cronica la percentuale di eicosanoidi, derivati dall'acido arachidonico, aumenta sia nel sangue che nei tessuti dell'ospite (Calder, 2006).

Figure 1 (left)



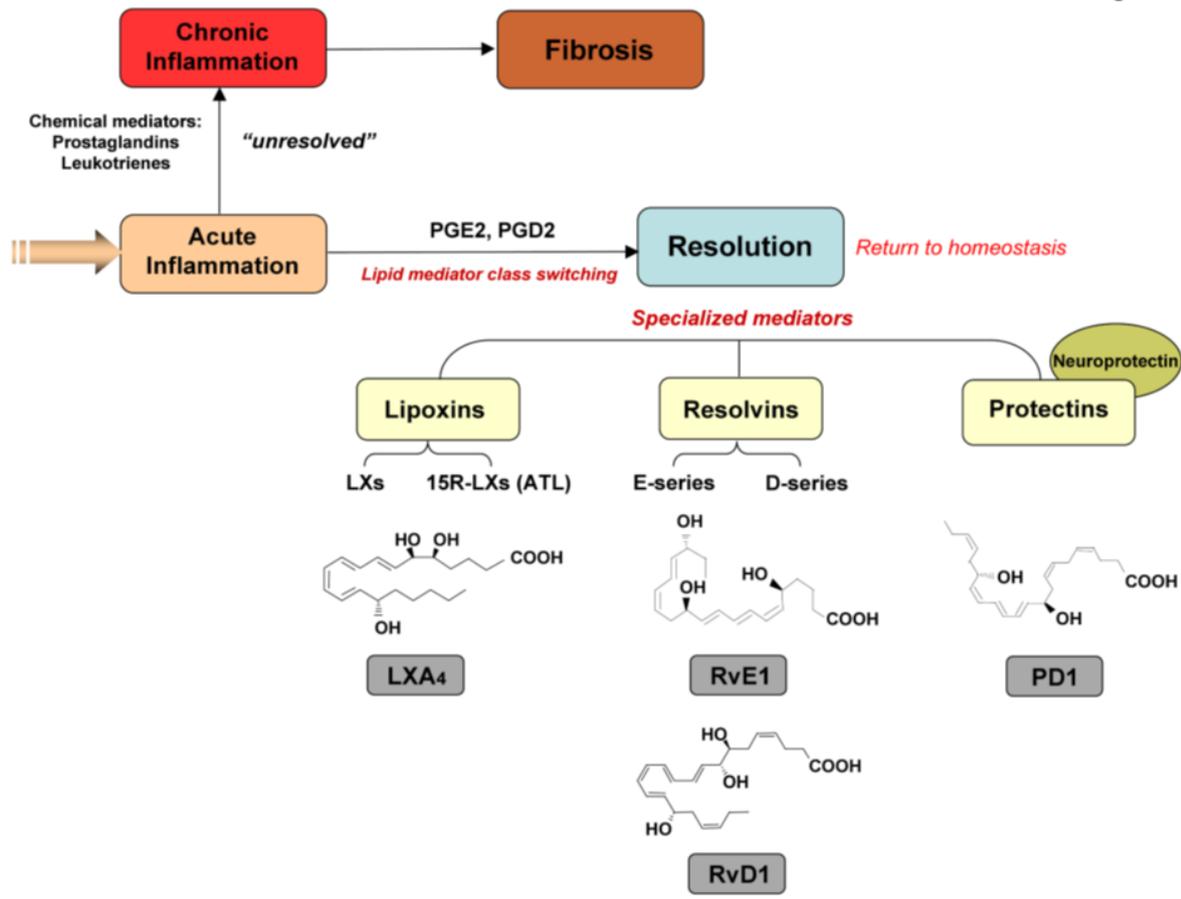
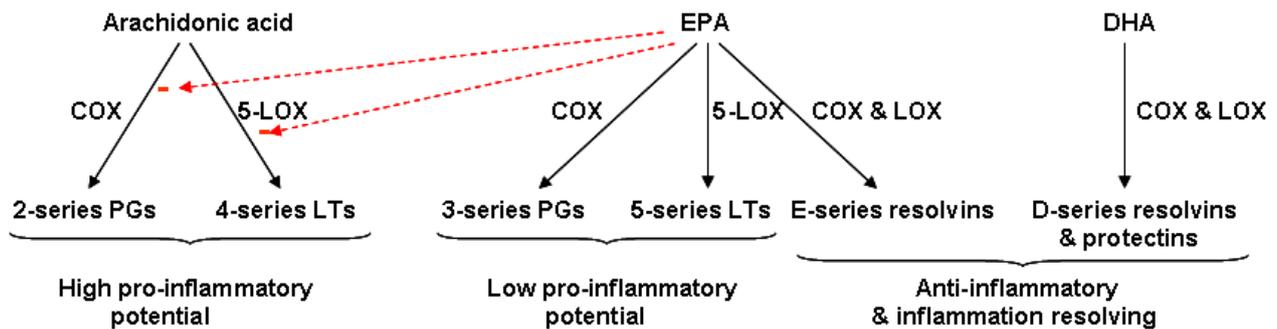


Figura 12. Decorso infiammatorio. Dopo l'iniziale invasione microbica, si ha il rilascio di chemioattrattanti esogeni, che attivano i ricettori presenti sui leucociti. Avviene l'azione antimicrobica ed il successivo reclutamento leucocitario ed il rilascio di mediatori chimici endogeni. I microrganismi vengono fagocitati ed eliminati. Anche in presenza di un trauma, si ha il rilascio di mediatori chimici (come B4, E2 e C5a). La compresenza di fattori endogeni ed esogeni promuove il reclutamento e la successiva chemiotassi, amplificata dalla presenza del leucotriene B4. L'esito dell'infiammazione acuta può essere la risoluzione o uno stato di infiammazione cronica (Serhan et al., 2008).

In generale gli eicosanoidi derivati dall'acido arachidonico svolgono un'azione pro infiammatoria, anche se è stato dimostrato che la PGE2 abbia sia effetti pro che anti infiammatori e che la lipossina A4 svolga un'azione esclusivamente antinfiammatoria (Calder, 2010).

Wittwer and Hersberger (2007) hanno dimostrato come il disequilibrio tra la biosintesi di eicosanoidi pro e anti infiammatori sono una delle cause di patogenesi nelle malattie vascolari dell'uomo.

Figura 13. Biosintesi degli eicosanoidi (Calder, 2010).



In molti studi è stato notato un innalzamento di questi mediatori in patologie della ghiandola mammaria bovina. Giri et al (1984) hanno mostrato una maggiore concentrazione sia PG1 α che di PG2 α mentre Anderson et al. (1985) di TXB2 nel latte dopo l'infusione di LPS. In una ricerca effettuata tramite infezione con *Escherichia coli* (Peter et al, 1990) è stato mostrato un incremento di PGF2, TXB2 e prostaciclina. Atroshi et al. (1986 e 1987) ha monitorato casi di mastiti causate da *S. uberis*, *S. aureus* e *Micrococcus species* rilevando un aumento di PGE2, PGF2 α e TXB2. In uno studio più recente sulle mastiti croniche causate da *S. uberis*, *S. agalactiae* e *S. aureus* Boutet et al. (2003) hanno evidenziato che il LTB4 aumentava. Analizzando tali risultati si può quindi affermare che differenti tipi di patogeni favoriscono comunque il rilascio di eicosanoidi nel latte infetto.

I leucotrieni sono invece coinvolti direttamente in due step della risposta dell'ospite: inducono il reclutamento leucocitario e promuovono il respiratory burst e la produzione di citochine (Zipser and Laffi, 1985; Williams and Higgs, 1988; Bottoms and Adams, 1992). Secondo Bannermann (2008) il leucotriene B4 è il più potente chemioattrattante endogeno.

Silvestre et al. (2011) hanno effettuato uno studio su bovine alimentate con un supplemento di ω 3, ed è stata notata una migliore risposta della fase acuta e un rafforzamento delle funzioni neutrofile nell'arco del periparto. Un aumento del contenuto di ω 3 nelle cellule endoteliali bovine possono

mitigare la risposta pro infiammatoria, come suggeriscono Contreras et al. (2012), grazie ad un aumento di alcuni ossilipidi, quali resolvine, protectine e lipossine.

4.2 Esperimento 2

Sono stati valutati alcuni parametri qualitativi e metabolici del latte e l'espressione di 3 geni (IL-8, SELL, GSN) per stabilire lo stato di salute delle Frisone.

4.2.1 Grasso

Ci sono risultati contrastanti in letteratura sul contenuto di grasso al variare della SCC.

Auldism and Hubble (1998) riportano una diminuzione, adducendola alla diminuzione della funzionalità delle cellule mammarie, come anche Malek dos Reis et al (2013), che la evidenzia durante una IMI causata da batteri di differenti specie. Molti altri autori mostrano invece un aumento nel grasso totale nel latte mastitico (Pyorala et al, 2003; Holdaway et al., 1990; Shuster et al., 1991; Moyes et al., 2014) in accordo con i dati riportati in Tabella 9. Moyes et al. (2009) rilevano una down regulation del network dei geni come anche dei pathway associati alla sintesi del grasso. E' bene sottolineare che, durante il periodo di transizione, il metabolismo lipidico si modifica (Sundrum A., 2015), perciò una variazione della percentuale del grasso potrebbe essere influenzata sia dallo stato patologico sia da quello fisiologico. Secondo Bruckmaier et al. (2004) l'aumento indica una riduzione della sintesi del lattosio e quindi una contrazione del volume del latte prodotto, mentre la sintesi del grasso è solo leggermente modificata (Benites et al., 2002).

4.2.2 Lattosio

Questo importante zucchero viene sintetizzato all'interno delle cellule mammarie e quando un'infezione provoca un danno al parenchima mammario la sua biosintesi risulta diminuita. Inoltre, in seguito alla rottura della parete emato-mammaria, il lattosio viene riassorbito nel sangue e per questo si trova in elevata concentrazione nelle urine e nel sangue di animali infetti. La sua diminuzione altera l'equilibrio osmotico del latte, causando un minore afflusso di acqua nelle cellule mammarie e dunque una diminuzione nel volume di latte prodotto (Auldism et al., 1998; Pyorala et al., 2003; Bruckmaier et al., 2004; Shuster et al., 1991; Nguyen et al., 1998). L'equilibrio tra il lattosio e i minerali solubili conserva la pressione osmotica del latte. Perciò l'afflusso di minerali nel latte si tramuta in una necessaria diminuzione di questo disaccaride, proprio per tale

bilancio. Spesso il lattosio è stato considerato come un marcatore di mastiti, specialmente a livello di quarti, dato che la sua riduzione si registra già durante un modesto incremento di SCC (Berglund et al., 2007).

4.2.3 Isocitrato

Numerosi studi hanno connesso le variazioni del contenuto dell'isocitrato nel latte bovino con la sintesi degli FA durante la lattazione (Larsen, 2014). Infatti la sintesi è costituita da una serie di step riduttivi che coinvolgono l'ossidazione del NADH. Una significativa parte della produzione di tale nucleotide nella ghiandola mammaria dei ruminanti si crede provenga dalla decarbossilazione ossidativa dell'isocitrato (Baumann, 1970). E' stata perciò posta grande attenzione all'isocitrato e all'attività della isocitrato deidrogenasi per descrivere lo stato fisiologico del ruminante e della produzione di latte (Larsen, 2014). Garnsworthy et al. (2006) hanno concluso che la variazione dell'isocitrato con lo stadio di lattazione è relazionata con la sintesi de novo degli FA e che tale relazione sia indipendente dalla dieta e dalla resa in latte. Le correlazioni evidenziate in tabella 10 sono in linea con quelle riportate da Larsen (2014).

4.2.4 Glucosio e glucosio-6-fosfato

L'interdipendenza tra i tre zuccheri (lattosio, glucosio e glucosio6-fosfato) del latte è un indice dello stato energetico dell'animale. Le cellule epiteliali mammarie sono prive della glucosio-6- fosfatasi e non possono perciò sintetizzare il glucosio. Il contenuto di questo carboidrato nel latte deriva essenzialmente dall'assorbimento di quello ematico, il quale è utilizzato per la sintesi del lattosio, la conversione a G6P, la generazione di equivalenti riduttivi nel pathway dei pentoso fosfati, la completa ossidazione nel ciclo dell'acido citrico ed infine la conversione a glicerolo per la sintesi dei trigliceridi (Larsen and Moyes, 2015). Durante la lattogenesi il glucosio nel sangue diminuisce per il rapido aumento di richiesta di nutrienti per favorire la produzione di latte (Sundrum, 2015). Il contenuto del glucosio libero e fosfato nel latte secreto non è ancora molto ben definito. In un vecchio lavoro (Kuhne and White, 1975) si ipotizzava che dipendesse dalla velocità di trasporto del glucosio all'interno della cellula e dalla velocità di utilizzo intracellulare. Faulkner and Peaker (1987) avallano questa ipotesi attraverso i risultati di un esperimento in vivo, in cui dimostrano l'equivalenza della concentrazione del glucosio in cellule mammarie isolate e nel latte, e il rapido equilibrio dello zucchero attraverso le membrane apicale cellulari. Si può anche presupporre che il

glucosio libero possa anche derivare dall'idrolisi degli oligosaccaridi dopo la secrezione del latte (Larsen and Moyes, 2015). Anche nel presente studio si ritrova una buona correlazione positiva con il lattosio, che riflette le condizioni intracellulari, e una moderata ed inversa correlazione tra G6P e lattosio (Larsen and Moyes, 2015). In un esperimento effettuato da Moyes et al. (2014) sono stati infettate delle Frisone con E. coli e sono stati misurati, a differenti ore dall'inoculo, dei parametri qualitativi del latte insieme ad alcuni parametri metabolici da noi osservati. Moyes et al (2014) riportano un innalzamento a 36 ore dall'inoculo del glucosio, G6P, BHB e citrato con una diminuzione del solo lattosio, ma dopo 180 h (7 g) non si hanno differenze significative. Una minore concentrazione di glucosio nel latte delle High potrebbe essere invece spiegata da una ridotta domanda per la sintesi del lattosio in risposta all'IMI. Studi trascrittomici di confronto tra quarti infetti e sani, non rivelano in realtà alcun cambiamento nei geni coinvolti direttamente nel metabolismo del glucosio (Buitenhuis et al., 2011). Le cellule fagocitarie più attive durante l'infiammazione necessitano del glucosio, in quanto un suo efficiente uptake favorisce la proliferazione cellulare, la sopravvivenza, la differenziazione e la capacità di fagocitosi. La minore disponibilità di glucosio ad inizio lattazione può quindi limitare le funzioni del sistema immunitario e aumentare conseguentemente il rischio di infezioni (Ingvarsen and Moyes, 2012).

4.2.5 BHB

Drackley et al. (1999) hanno osservato dopo il parto un aumento della concentrazione del BHB ematico, dovuto al NEB (bilancio energetico negativo) e alla successiva mobilizzazione dei lipidi tissutali, mentre Moyes et al. (2014) hanno riscontrato una diminuzione nel sangue ed un suo aumento nel latte in vacche infettate. Ospina et al. (2010) in uno studio su bovine allevate negli USA hanno evidenziato la correlazione tra i cambiamenti metabolici e l'incremento con malattie metaboliche e infettive.

Bovine in chetosi, per esempio, sono più suscettibili a contrarre malattie infettive come mastiti, a causa dell'impatto negativo che mostra il BHB sui meccanismi antimicrobici leucocitari (Suriyasathaporn et al., 2000). L'aumento della sua concentrazione ematica è stata associata ad una ridotta funzione neutrofila anche nel corso di metriti (Hammon et al. 2006). Alcuni studi indicano che lo stress ossidativo, che induce tale molecola, e la conseguente attivazione di segnali a cascata pro infiammatori, causa lesioni infiammatorie agli epatociti nelle bovine (Shi et al., 2014). Le nostre misurazioni non hanno mostrato alcuna variazione significativa del suo contenuto nel latte dei due gruppi, né correlazioni significative con gli altri parametri.

4.2.6 Urea

La concentrazione dell'urea nel latte è influenzata dall'alimentazione, in particolare della concentrazione di proteine grezze e del loro intake. Quindi l'urea è un utile indicatore dell'efficienza dell'utilizzo dell'azoto per la produzione di latte. Molti studi hanno dimostrato che la sua concentrazione risente di diete non bilanciate, di cambiamenti stagionali e dello stadio di lattazione (Bjerre-Harpoth et al., 2012; Huhtanen et al., 2015). Anche Nousianen et al. (2004) riportano un'associazione negativa tra urea e contenuto proteico del latte come anche Rzewska and Strabel (2013). Questa correlazione negativa potrebbe essere spiegata dal NEB sul metabolismo proteico e sull'utilizzo dell'azoto. La lipidosi epatica rende difficoltosa la sintesi dell'urea e si traduce in un abbassamento del suo contenuto nel latte. Risultato da noi non riscontrato.

4.2.7 Acido urico

L'acido urico è considerato un potente antiossidante, simile all' α -tocoferolo, al carotene e all'acido ascorbico, permette perciò di aumentare la stabilità ossidativa del latte e dei prodotti caseari (Ostdal et al., 2000). E' oltretutto indicato come un potente indicatore del turn over proteico nel ruminante in vacche ad elevate prestazioni (Gonzales-Ronquillo et al., 2003; Tas and Susenbeth, 2007).

Considerando che non è stata dimostrata alcuna variazione significativa tra i due gruppi nei metaboliti finora discussi (BHB, isocitrato, urea, acido urico) possiamo affermare che le bovine in esame non evidenziano difficoltà metaboliche all'aumentare della SCC.

4.2.8 NAGasi e LDH

È stato stabilito già nella metà degli anni 70 che il livello di NAGasi nel latte può essere utilizzato per stimare la SCC con una misurazione spettrofotometrica, poi migliorata dall'analisi fluorimetrica (Kitchen et al., 1978). Larsen (2005; Larsen et al., 2010) ha sviluppato poi un metodo più efficiente ed economico per la misura dell'attività dei due enzimi. L'NAGasi è uno degli enzimi autoctoni che, riflettendo il grado di infiammazione, aumenta in particolare in presenza di patogeni major rispetto ai minor. La sua attività è inoltre maggiore ad inizio lattazione e diminuisce con il tempo, già dopo cinque giorni, nei quarti sani (Pyorala et al., 2011). Provenendo dall'epitelio delle cellule mammarie, l'enzima ha mostrato in vari studi la capacità di differenziare i casi subclinici da quelli clinici (Chagunda et al., 2006; Pyorala et al., 2011). E' bene sottolineare che nel latte sano la sua attività varia in modo spesso considerevole come mostrato da Hovinen et al. (2016).

Chagunda et al. (2006) hanno rilevato che l'attività di LDH aumenta nel latte durante la mastite clinica. Tuttavia, il livello dell'enzima è influenzato dal numero di parti, dallo stadio di lattazione e dal mese di produzione. Pertanto, è importante prendere in considerazione questi fattori prima di classificare le bovine come malate. L'associazione tra i livelli di LDH e SCC era più forte nelle vacche clinicamente mastitiche che in quelle sane. Si pensava che l'origine dell'elevata concentrazione di LDH provenisse da leucociti e dal parenchima cellulare della mammella (Bogin 1977), poi Kato et al. (1989) hanno scoperto che granulociti e linfociti nel latte mastitico potrebbero in parte contribuire allo spostamento degli isoenzimi LDH nel latte. Tuttavia, Chagunda et al. (2006) hanno indicato che le cellule somatiche (neutrofili) potrebbero contribuire alla presenza di questo enzima. Con il confronto tra l'attività dei due enzimi, l'LDH sembra essere migliore nella classificazione delle vacche malate rispetto al NAGasi, poiché LDH è un indicatore più sensibile nel predire l'infiammazione con un quadro clinico ben delineato. Secondo Hovinen et al. (2016) invece l'accuratezza dell'NAGasi nel differenziare tra mastiti cliniche e subcliniche è maggiore, adducendo a tale affermazione l'aver considerato latte dei singoli quarti e non il totale dei quattro.

La forte correlazione tra SCC, LDH e NAGasi (tabella 10) conferma l'importanza di questi tre parametri, ormai, convenzionalmente riconosciuti, per stabilire, attraverso il latte, la presenza di un'infiammazione a livello della ghiandola mammaria.

4.2.9 Espressione dei geni dell'IL 8, SELL e GSN

L'infiammazione inizia il processo immunologico di eliminazione degli agenti patogeni e delle tossine con risposte ordinate e controllate.

Il movimento delle cellule verso il sito infiammatorio/infetto è indotto dalla sovraespressione di molecole di adesione sulla superficie delle cellule endoteliali, le quali permettono prima il legame e successivamente la diapedesi dei leucociti. Le prime cellule che arrivano sul sito infiammato sono i granulociti, monociti/macrofagi mentre i linfociti appaiono più tardi. Granulociti e monociti/macrofagi sono coinvolti nell'eliminazione di patogeni, nel ripulire i debris cellulari e tissutali e nella riparazione dei tessuti. Le attività di tali cellule sono indotte da alcuni composti, come i componenti delle pareti cellulari di batteri. Uno di questi è l'endotossina batterica (nota anche come lipopolisaccaride, LPS), presente sulla parete cellulare dei batteri Gram-negativi. L'LPS può attivare direttamente i monociti/macrofagi inducendoli a formare citochine come il tumour necrosis factor (TNF)- α , l'IL-1, l'IL-6 e l'IL-8, gli eicosanoidi, come la prostaglandina (PG) E₂, l'ossido nitrico e altri mediatori.

L'endotossina induce anche l'espressione di molecole di adesione sulla superficie delle cellule endoteliali e dei leucociti. Le citochine prodotte da monociti / macrofagi servono anche a regolare la risposta dell'intero corpo alle infezioni. I mediatori infiammatori forniscono un collegamento tra la risposta immunitaria innata e quella acquisita.

Quando si verificano delle risposte infiammatorie incontrollate o inappropriate si ha una iper-espressione delle molecole di adesione dell'endotelio e dei leucociti, la presenza di forme solubili di molecole di adesione nella circolazione, il sequestro dei leucociti nei siti in cui non si trovano di solito, la produzione di mediatori dell'infiammazione e danni ai tessuti dell'ospite.

Crookenden et al. (2016) in un esperimento effettuato su bovine a medie prestazioni allevate al pascolo, ha evidenziato nel sangue dei cambiamenti nell'espressione di geni coinvolti nel funzionamento dei neutrofili, durante il periodo di transizione, ma non ha evidenziato alcuna variazione significativa tra 7 e 14 gg post partum sia del gene IL-8 che di quello della SELL. Fonseca et al. (2009) hanno eseguito una ricerca per valutare il complesso network di geni coinvolti nella risposta infiammatoria durante una mastite, mostrando una upregulation dell'IL-8 nelle cellule somatiche del latte di animali infetti. Moyes et al. (2009) hanno determinato una risposta trascrittomica intensa e rapida all'infezione indotta con *S. uberis*: nel tessuto mammario i geni che esprimevano per IL-8 e la SELL erano quelli più fortemente up regolati. Numerosi studi sulla ghiandola mammaria riportano nelle bovine infette, anche con differenti batteri, rispetto a quelle sane, pathway arricchiti dell'adesione dei granulociti e diapedesi, del segnale di chemochine, delle interazioni dei recettori citochine-citochine e del segnale del recettore NOD-like (Buitenhuis et al., 2011, Moyes et al., 2010; Mitterhuemer et al., 2010; Moyes et al., 2016). I neutrofili che circolano nel flusso ematico richiedono una costante fornitura di L-selectina per poter arrivare nei siti periferici, dove poi tagliano la proteina dalla membrana. Diez-Fraille et al, (2004) in uno studio effettuato sui neutrofili del sangue e del latte bovino hanno evidenziato come, durante la fase acuta dell'infiammazione mammaria, la percentuale di neutrofili CD62L + e CD11b + nel latte aumenta fino al raggiungimento di valori simili rilevati per i neutrofili del sangue. Questo aumento della percentuale CD62L + e CD11b + sembra essere correlato alla maggiore vitalità dei neutrofili osservata durante il corso delle mastiti causate da *E. coli*. Weber et al. (2001) hanno dimostrato che un'alta concentrazione di cortisolo nel sangue, vicino al parto, down regola sia l'mRNA che l'espressione della selectina, associando a tale fenomeno la neutrofilia e un aumento della suscettibilità alle infezioni. Durante una IMI una up regulation del gene SELL è stata evidenziata proprio a causa del TNF- α , che controlla l'espressione delle molecole di adesione (Pinte et al., 2016).

Chen et al. (2015) mostrano uno studio integrato di dataset di trascrittomica e di GWAS (genome wide association) del tessuto mammario di bovine infettate con *E. coli* o con *S. uberis*, entrambi patogeni predominanti nei casi clinici, mentre solo *S. uberis* lo è anche nei quadri subclinici. Sono riportati vari studi in vivo e in vitro del profilo di espressione in vacche evidenziando differenze tra infezioni da Gram positivi o da Gram negativi, non solo per il tempo e l'intensità dell'infezione, ma anche nelle differenti espressione geniche. I Gram-negativi come *E. coli* hanno una durata inferiore ma intensa, che induce un innalzamento veloce e deciso di citochine pro infiammatorie nel tessuto mammario mediato dal TLR4 indotto dal segnale dell'LPS, con il conseguente rapido afflusso di neutrofili. D'altra parte i Gram positivi come *S. uberis* causano una risposta più lenta e meno intensa, aumentando il segnale dell'IL-6 ma non del TNF- α e dell'IL-1 β (Schukken et al., 2011). Sono state evidenziate anche delle similitudini, a prescindere quindi dal tipo di batterio, nelle up regulation delle risposte innate come anche di geni relazionati al metabolismo dei grassi (Kimbrell et al., 2001). La possibilità di definire quali siano le risposte comuni contro le infezioni e quali siano i geni chiave associati a tali meccanismi, è fondamentale per sviluppare un'efficace strategia di selezione. Chen et al. (2015) identificano alcuni geni, tra cui IL-8 e a SELL, come promettenti geni candidati per la resistenza alle malattie, in particolare uno studio sui loro polimorfismi potrebbe delucidare una differente risposta all'infezione.

La resistenza all'infezione è indotta attraverso le citochine e un meccanismo basale incentrato sulla difesa strutturale dell'actina del citoscheletro. Tra le molteplici actin-binding protein la GSN ha mostrato un ruolo chiave in differenti meccanismi di controllo della morfologia cellulare e del movimento della membrana cellulare, regolando quindi processi quali la migrazione e l'invasione batterica. E' bene ricordare che la GSN sia un regolatore multifunzionale dei metabolismi cellulari che coinvolgono molteplici meccanismi, spesso indipendenti dalle sue strette funzioni regolatrici dell'actina. Uno studio su topi con una delezione nella sequenza della gelsolina ha evidenziato come le funzioni delle piastrine fossero alterate e la risposta infiammatoria lenta per una migrazione neutrofila ritardata (Witke et al., 1995). Nel latte bovino, durante un'infezione indotta con *S. uberis*, Smolenki et al., (2014) dimostrano una *upregulation* della GSN. In uno studio precedentemente condotto presso il CREA, è stata osservata la variazione della concentrazione della proteina nel tessuto mammario ovino nel corso della lattazione (Signorelli et al, 2012) ed in un successivo (Napolitano et al, pubblicazione in corso) si conferma una differente espressione del gene nelle cellule somatiche del latte ovino. La GSN è l'unico gene correlato in modo significativo con l'LDH e con il contenuto di grasso. Infatti essa ha un ruolo determinante nel movimento dei globuli di grasso verso le membrane apicali delle cellule e successiva estrusione nel lume alveolare (El-Loly,

2011; Smoczynsky et al., 2012). Zanabria et al. (2016) hanno dimostrato la funzione del globulo di grasso nell'immunità. Lin et al. (2012) hanno sottolineato come tale proteina possa influenzare il metabolismo e le vie di segnalazione lipidiche, come anche incentivare o inibire l'apoptosi a seconda delle condizioni fisiologiche, del tipo cellulare e dello specifico tessuto coinvolto, ed infine evidenziato il suo ruolo nelle patologie infiammatorie e croniche dell'uomo. Nel 2008 è stato pubblicato un lavoro che identificava la gelsolina del plasma come un biomarker di infiammazione (Di Nubile, 2008). In un altro studio, Lee et al. (2009) hanno mostrato come questa si leghi con l'actina e con dei mediatori bioattivi, presenti in un'infiammazione locale. In un recente studio sulla relazione tra GSN e processi infiammatori su linee cellulari di macrofagi murini (Cheng et al., 2017) è stato dimostrato che la proteina influenza la secrezione dell'IL-6, TNF- α e NO, prodotti dai macrofagi; in particolare inibisce il ruolo pro infiammatorio dell'IL-6, la quantità di NO e regola la produzione del TNF- α . Gli autori affermano che le funzioni dei macrofagi possono essere inibite o rafforzate dalla GSN, in base allo specifico quadro infiammatorio.

5 CONCLUSIONI

Dai risultati della presente ricerca, si evidenzia che i parametri direttamente correlati con la SCC e la risposta immunitaria finora discussi (C16:0, $\omega 6$, C18:2 c9c12), uniti ai due minerali (Na e K), potrebbero rappresentare dei biomarker di IMI, rapidi da identificare e soprattutto applicando MIR portatili online con l'apparato di mungitura, potrebbero offrire all'allevatore un riscontro immediato e puntuale in stalla, senza la necessità di attendere risultati dal laboratorio.

Questi sistemi di rilevazione, possono diventare davvero utili all'allevatore, perché garantiscono, oltre all'affidabilità nella misurazione dei parametri, l'elaborazione di dati mediante algoritmi validati, in modo da fornire un sistema chiaro e standardizzato d'interpretazione. Solo così l'allevatore potrà utilizzare tali dati per intervenire correttamente sulla gestione della mandria, o sul singolo animale, per correggere l'eventuale problema fisiologico e/o patologico.

Pur non essendo ancora disponibili le strutture dei glicani analizzati nel presente studio, si può presupporre che il GP2 e il GP9 possano essere dei potenziali indicatori, proprio grazie alle sensibili variazioni del profilo dei glicoma a stimoli esterni, come già discusso in precedenza.

Si evince inoltre che l'espressione della gelsolina possa essere un buon predittore dei cambiamenti delle concentrazioni di LDH, NAGasi e della conta somatica cellulare nel latte, quindi un buon indicatore dello stato di salute della mammella e della presenza di infiammazioni in corso, come mostrato anche dai molteplici riscontri bibliografici discussi.

Il passo successivo dovrebbe essere uno studio di associazione (fenotipi - alleli) come la GWAS per ricercare i meccanismi di difesa e i polimorfismi genici che possano alterare la risposta del singolo animale.

Un approccio sostenibile per ridurre l'incidenza delle malattie e migliorare la salute delle bovine da latte è la selezione genetica, mediante l'identificazione di polimorfismi genici atti a migliorare l'immunità innata (Pighetti et al., 2011) per animali meno suscettibili sia alle malattie che alla risposta infiammatoria (Bertoni et al., 2015). Tale miglioramento genetico potrebbe essere raggiunto in modo permanente e con un buon rapporto costo-efficacia. I geni candidati per la selezione genetica sono, tuttavia difficili da identificare a causa delle complesse interazioni in gioco: i geni e i pathway che sottendono alla resistenza, definita come abilità a ridurre la replicazione del patogeno nell'ospite, e la tolleranza, intesa come abilità dell'organismo a mantenere l'omeostasi, possono essere distinti o interconnessi esattamente come l'esito di

un'infezione è un risultato del bilancio tra i danni collaterali dei tessuti dell'ospite ed il controllo dell'invasione del patogeno (Glass, 2012).

E' fondamentale che le analisi relative ai controlli di qualità siano effettuate con tecniche analitiche veloci ed economiche affinché i costi analitici non gravino ulteriormente sui costi di produzione del latte. Oltretutto per gli allevatori, la decisione di investire nell'utilizzo di sensori per essere supportati nella gestione sanitaria delle bovine da latte, dipenderà in gran parte dalla redditività che l'utilizzo di tali sistemi sarà in grado di garantirgli.

Per determinare la redditività, oltre alle caratteristiche del sistema preso in considerazione, è fondamentale valutare:

- Le caratteristiche di ogni singola mandria e del contesto economico in cui si opera.
- L'entità delle perdite economiche legate alle condizioni non ottimali e il margine di miglioramento possibile per il parametro preso in esame.
- La capacità dell'allevatore di mettere in pratica le modifiche gestionali necessarie.

Gli studi pubblicati in merito alla convenienza economica degli investimenti, da parte degli allevatori, nei sistemi di gestione basati sui sensori sono piuttosto rari. Analogamente, il valore economico e gestionale delle informazioni ricavate da tali sistemi è ancora poco chiaro (Rutten et al., 2013).

In questo senso le tecniche analitiche online impieganti la spettroscopia infrarossa a Trasformata di Fourier paiono esser promettenti a riguardo, ancorché al momento prevalentemente utilizzate per monitorare le bovine da latte e quasi esclusivamente per la predizione delle concentrazioni dei composti maggioritari.

Resta tuttavia primario l'obiettivo di realizzare in allevamento i sistemi di profilassi possibili (controlli termografici, di ingestione, BCS, ruminazione, visita post parto, parametri relativi a metabolismo energetico, stress ossidativo e stato infiammatorio) nella cornice di Requisiti Minimi di controllo e prevenzione che contraddistinguano le Buone Pratiche di Allevamento (Regolamento 852/2004/CE sull'igiene dei prodotti alimentari). Tali interventi devono collocarsi nell'ambito di una robusta cornice di impiantistica zootecnica che assicuri il rispetto di fondamentali parametri di

benessere animale e di piani di profilassi aziendali che includano almeno i seguenti aspetti (Trevisi et al., 2011):

- sanitari: piani vaccinali e antiparassitari;
- gestionali: cure podali, manipolazioni degli animali;
- alimentari: alimentazione equilibrata per apporto energetico, rapporto energia/massa, percentuale e tipologia di fibra, integrazioni minerali;
- riproduttivi: riconoscimento tempestivo dei calori e diagnosi precoce di gravidanza.

Questi interventi dovrebbero rientrare in Procedure Operative Standard. E' infatti sulla corretta e sinergica applicazione di questi interventi che si può fondare "la lattazione di successo": bovine in buone condizioni di benessere e con ottime performance, limitato uso di farmaci, quindi produzioni più sicure per il consumatore e di maggiore qualità, allevatori e tecnici più soddisfatti (Amadori, 2015).

Infine, non si può ignorare il fatto che i margini economici per gli interventi di cui sopra debbano essere costruiti sulla base di un adeguato riconoscimento del merito degli allevatori in termini di sicurezza alimentare nella produzione primaria. E' vitale pertanto che agli allevamenti migliori in termini di biosicurezza e di consumo degli antibiotici sia riconosciuto un valore aggiunto sul prezzo di vendita del latte. Tale misura potrebbe costituire uno strumento formidabile di riconoscimento e valorizzazione delle filiere lattiero-casearie nazionali (Amadori, 2015).

6 BIBLIOGRAFIA

Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Sandur, S. K., Pandey, M. K., and Sethi, G. 2006. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 72: 1605-1621.

Aitken SL, Corl CM and Sordillo LM. 2011. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*.16:291-304.

Akira S and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature. Reviews Immunology*, 4, 7:499–511.

Akira S, S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 4: 783–801, 2006

Aleri JW, Hine BC, Pyman MF, Mansell PD, Wales WJ, Mallard B Fisher AD. 2016. Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period. *Res Vet Sci*. 108: 8-17.

Alnakip ME, M Quintela-Baluja, K Bohme, I Fernandez-no, S Caamano-Antelo, P Calo-Mata and J Barros-Velasquez. 2014. The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions.. *J Vet med*

Amadori M. 2015. Impiego combinato di parametri clinici, zootecnici ed immunologici per una diagnosi precoce e/o predittiva delle affezioni delle bovine da latte nel periparto. *Ruminantia*, 8.

Anderson, K. L., Kindahl, H., Petroni, A., Smith, A.R. and Gustafsson, B.K. 1985. Arachidonic acid metabolites in milk of cows during acute coliform mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 46:1573.

Arora PD, M.W.C. Chan, R. A. Anderson, P. A. Janmey, and C. A. McCulloch. 2005. Separate Functions of Gelsolin Mediate Sequential Steps of Collagen Phagocytosis. *Mol Biol Cell*. 16(11): 5175–5190.

Atroshi, F., Parantainen, J., Kangasniemi, R. and Osterman, T. 1987. Milk prostaglandins and electrical conductivity in bovine mastitis. *Veterinary Research Communications* 11: 15-22.

Auldist, M.J., Hubble, I.B., 1998. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 53: p. 28-36

Baldwin, A. S., Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14: 649-683.

Bannerman DD, A. Chockalingam, M. J. Paape, and J. C. Hope.2005.The bovine innate immune response during experimentally-induced *Pseudomonas aeruginosa* mastitis. *Vet Immun and Immunopath.* 107, 3-4: 201–215.

Bannerman, D.D. 2009. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. *Journal of Animal Science* 87: 10-25.

Barkett, M. and Gilmore, T. D. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6910-6924

Barnes, P. J. and Karin, M. 1997. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336: 1066-1071.

Bastin C, Théron L, Lainé A, Gengler N. 2016. On the role of mid-infrared predicted phenotypes in fertility and health dairy breeding programs. *J. Dairy Sci.* 99:1–15.

Bauman, D. E., R. E. Brown, and C. L. Davis. 1970. Pathways of fatty acid synthesis and reducing equivalent generation in mammary gland of the rat, sow, and cow. *Arch. Biochem. Biophys.* 140:237–244.

Benites, N.R., et al., 2002. Aetiology and histopathology of bovine mastitis of spontaneous occurrence. *Journal Of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases And Veterinary Public Health.* 49(8): p. 366

Berglund, I., G. Pettersson, K. Östensson and K. SvennerstenSjaunja, 2007. Quarter Milking for Improved Detection of Increased SCC. *Reprod. Dom. Anim.*, 42: 427–432

Bertoni G., Trevisi E., Han X., Bionaz M. 2008. Effects of Inflammatory Conditions on Liver Activity in the Puerperium and Consequences for Performance in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 91:3300-3310.

Bertoni G, Minuti A, Trevisi E.2015. Immune system, inflammation and nutrition in dairy cattle. *Ani Prod Sci.* 55:943-948.

Bessa, R.J.B., Maia, M.R.G., Jeronimo, E., Belo, A.T., Cabrita, A.R.J., Dewhurst, R.J., Fonseca, A.J.M., 2009. Using microbial fatty acids to improve understanding of the contribution of solid associated bacteria to microbial mass in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150, 197–206

Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. 2001.*Clin Pharmacol Ther.* Mar;69(3):89-95.

Bitman J, D. L. Wood, S. A. Bright, and R. H. Miller.1988. “Lipid composition of bovine teat canal keratin. *J Dairy Sci.* 71, 5:1389–1395.

Bitman J, D. L. Wood, S. A. Bright et al. 1991. Lipid composition of teat canal keratin collected before and after milking from Holstein and Jersey cows. *J Dairy Sci.* 74, 2: 414–420.

Bjerre-Harpoth V, Friggens NC, Thorup V M, Larsen T, Damgaard BM, Ingvarsten K, Moyes KM. 2012. Metabolic and production profiles of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation. *J Dairy Sci.*95:2362–2380.

Bogin E, Ziv G, Avidar J, Rivetz B, Gordin S, Saran A. 1977 .Distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in normal and inflamed bovine udders and milk. *Res Vet Sci.* Mar;22(2):198-200.

Bottoms, G. D. and Adams, H.R. 1992. Involvement of prostaglandins and leukotrienes in the pathogenesis of endotoxemia and sepsis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200:1842–1848.

Boutet, P., Bureau, F., Degand, G. and Lekeux, P. 2003. Imbalance between lipoxin A4 and leukotriene B4 in chronic mastitis-affected cows. *Journal of Dairy Science* 86: 3430-3439.

Bramley AJ and F. H. Dodd. 1984. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control-progress and prospects. *J Dairy Res.* 51, 3: 481–512.

Bruckmaier R.M., O., C.E., Blum, J.W., 2004. Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. *Veterinary medicine-Czech*, 8(283-290).

Buitenhuis B, Rontved CM, Edwards SM, Ingvarsten KL, Sorensen P. 2011. In depth analysis of genes and pathways of the mammary gland involved in the pathogenesis of bovine *Escherichia coli*-mastitis. *BMC Genomics.*;12:130–140.

Burton JL1, Kehrlı ME Jr, Kapil S, Horst RL.1995. Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. *J Leukoc Biol.* 57(2):317-25.

Cai TQ, Weston PG, Lund LA, Wagner WC. 1994. Association between Neutrophil Functions and Periparturient Disorders in Cows. *Amer J Vet Res.* 55, 7: 934-943.

Calder PC.2006. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 75:197–202.

Calder PC. 2010. Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes. *Nutrients*, 2, 355-374

Capuco AV, S. A. Bright, J.W.Pankey,D. L.Wood, R.H.Miller, and J. Bitman. 1992. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *J dairy sci.* 75, 8: 2126–2130.

Capuco AV, G. A. Mein, S. C. Nickerson et al.1994. Influence of pulsationless milking on teat canal keratin and mastitis. *J Dairy Sci.* 77, 1:64–74.

Chiplev N, G. Kalinova, H. Daskalov and A. Slavova. 2017. Study on the oxidative changes in milk lipids, induced by subclinical mastitis and different milking regimes in cow. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20, No 2, 161–168

Chagunda MGG, Larsen T, Bjerring M, Ingvarsten KL. 2006. L-lactate dehydrogenase and N-acetyl- β -D-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis. *J Dairy Res.*;73:431–440

Chandler R. L., Reid I. M., Harrison R. & France B. R. 1974. *Journal of Comparative Pathology* 84, 517.

Cheng Y, Hu X, Liu C, Chen M, Wang J, Wang M, Gao F, Han J, Sun D, Zhang C, Min R. 2017. Gelsolin Inhibits the Inflammatory Process Induced by LPS. *Cell Physiol Biochem* .41:205-212

Comba, G., L. Degano, P. Basiglio, e R. Arru. Fossano (CN) 1995. Programma di miglioramento dei formaggi a denominazione d'origine Bra e Raschera. Atti del Convegno Nazionale .Parliamo di produzione e trasformazione del latte. 159-167

Concha C, O. Holmberg, and B. Morein, 1978. Proportion of Band T-lymphocytes in normal bovine milk. *J Dairy Res.* 45, 2: 287–290

Contreras GA, O'Boyle NJ, Herdt TH, et al. 2010. Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *J Dairy Sci*;93(6):2508–16.

Corradini C. 1995. *Chimica e tecnologia del latte*. Tecniche Nuove.

Cozzi, R., Protti P., Ruaro T. (2001). *Analisi Chimica Strumentale*, seconda edizione, vol. B: Metodi ottici. Zanichelli.

Crookenden MA, Heiser A, Murray A, Dukkupati VSR, Kay JK, Looor JJ, Meier S, Mitchell MD, Moyes KM, Walker CG, Roche JR. 2016. Parturition in dairy cows temporarily alters the expression of genes in circulating neutrophils. *J Dairy Sci*.99(8):6470- 6483.

Crockett-Torabi E, Sulenbarger B, Smith CW, et al. 1995. Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules. *J Immunol* .154:2291–2302.

Dairyman's Digest 2009. What you should know about somatic cells. Winter issue

Douglas GN, Rehage J, Beaulieu AD, Bahaa AO, Drackley JK. 2007. Prepartum nutrition alters fatty acid composition in plasma, adipose tissue, and liver lipids of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*. 90: 2941–2959.

de Heredia FP, Gomez-Martinez S, Marcos A. 2012. Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc*;71(2):332–8.

De Marchi M., Penasa M., Cecchinato A., Mele M., Secchiari P., Bittante G. 2011. Effectiveness of mid-infrared spectroscopy to predict fatty acid composition of Brown Swiss bovine milk. *Animal* 5, 1653–1658

Diez-Fraille A, J Mehrzad, E Meyer, L Duchateau, C Burvenich, 2004, Comparison of L-selectin and Mac-1 expression on blood and milk neutrophils during experimental *Escherichia coli*-induced mastitis in cows. *AJVR*, Vol 65, No. 8

Di Nubile MJ. 2008. Plasma gelsolin as a biomarker of inflammation. *Arthritis Res Ther* 10:124.

de Roos, A. P. W., H. J. C. M. van den Bijgaart, J. Horlyk, and G. de Jong. 2007. Screening for subclinical ketosis in dairy cattle by Fourier transform infrared spectrometry. *J. Dairy Sci*. 90:1761–1766

dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*. Apr;83(2):433-73

El-Loly. Composition, Properties and Nutritional Aspects of Milk Fat Globule Membrane– a Review. 2011. *Pol J Food Nutr Sci*.61(1):7-32.

Etzion Y., Linker R., Cogan U., Shmulevich I. 2004. Determination of Protein Concentration in Raw Milk by Mid-Infrared Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance Spectroscopy. *Journal of Dairy Science* 87, 2779–2788.

Faulkner A and Peaker M 1987. Regulation of mammary glucose metabolism in lactation. In *The mammary gland: development, regulation and function* (ed. MC Neville and CW Daniel), pp. 535–562. Plenum Press, New York

Fievez v., E. Colman, J.M. Castro-Montoya, I. Stefanov, B. Vlaeminck. 2012. Milk odd- and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function—An update. *Animal Feed Science and Technology* 172 : 51– 65

Ferrand M., Huquet B., Barbey S., Barillet F., Faucon F., Larroque H., Leray O., Trommenschlager J.M., Brochard M. (2011). Determination of fatty acid profile in cow's milk using mid-infrared spectrometry: Interest of applying a variable selection by genetic algorithms before a PLS regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 106, 183-189.

Fonseca I, Vendramini Silva P, Lange CC, Guimarães MFM, Del Cambre Amaral Weller MM, Silva Sousa KR, Lopes PS, Guimarães JD, Guimarães, SEF.2009. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. *Genet Mol Biol.*;32(4):776-781.

Garnsworthy PC, Masson LL, Lock AL, Mottram TT. 2006. Variation of Milk Citrate with Stage of Lactation and De Novo Fatty Acid Synthesis in Dairy Cows. *J Dairy Sci.*89:1604–1612.

Gewirtz, L.S. Collier-Hyams, A.N. Young, T. Kucharzik, W.J. Guilford, J.F. Parkinson, I.R. Williams, A.S. Neish, J.L. Madara, 2002. Lipoxin A4 analogs attenuate induction of intestinal epithelial proinflammatory gene expression and reduce the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis, *J. Immunol.* 168 :5260–5267.

Gilmore, T. D. 1999. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 18: 6842-6844.

Giri, S. N., Chen, Z., Carroll, E.J., Mueller, R., Schiedt, M.J. and Panico, L. 1984. Role of prostaglandins in pathogenesis of bovine mastitis induced by *Escherichia coli* endotoxin. *Am. J. Vet. Res.* 45:586–59.

Glass EJ. 2012. The molecular pathways underlying host resistance and tolerance to pathogens. *Frontiers in genetics.* 3, 263.

Gonzales-Ronquillo M, Balcells J, Guada JA, Vicente F. 2003. Purine derivative excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. *J Dairy Sci.* 86:1282–1291.

Grommers, F. J., D. Van De Geer, H. Van Der Vliet, P. A. J. Henricks, and F. P. Nijkamp. 1989. Polymorphonuclear leukocyte function: relationship between induced migration into the bovine mammary gland and in vitro cell activity. *Vet. Immunol. Immunopath.* 23:75-83

Groves, E., Dart, A.E., Covarelli, V., and Caron, E. (2008). Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1957–1976.

Hamann J., and Krömker V. 1997. Potential of specific milk composition variables for cow health management. *Livest. Prod. Sci.* 48:201-208.

Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet Immunol Immunopathol.* 113: 21–29.

Harmon RJ. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts, *J Dairy Sci.* 77,7: 2103–2112.

Heuer, C., H. J. Luinge, E. T. G. Lutz, Y. H. Schukken, J. H. van der Maas, H. Wilmink, and J. P. T. M. Noordhuizen. 2001. Determination of acetone in cow milk by Fourier transform infrared spectroscopy for the detection of subclinical ketosis. *J. Dairy Sci.* 84:575–582.

Hoffmann G., Totzke G., Seibel M., Smolny M., Wiedermann F.J., Schoberbergers R W. 2001. In vitro modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide synthesis by procalcitonin. *Crit Care Med.*; 29: 112-116.

Holdaway, R.J.,1990. A comparison of methods for the diagnosis of bovine subclinical mastitis within New Zealand dairy herds. Thesis (Ph. D.) Massey University.

Hovinen M, Simojoki H, Pösö R, Suolaniemi J, Kalmus P, Suojala L, Pyörälä S. 2016. N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in cow milk as an indicator of mastitis. *J Dairy Res.*83:219–227.

Hurley DJ, M. H. Kensinger, A. M. Mastro, and R. A. Wilson. 1990. An evaluation of the mononuclear cells derived from bovine mammary gland dry secretions using leukocyte antigen specific monoclonal antibodies, light scattering properties and non-specific esterase staining, *Vet Immunol Immunopathol*, 25, 2: 177–193.

Huhtanen P, Cabezas-Garcia EH, Krizsan SJ, Shingfield KJ. 2015. Evaluation of between-cow variation in milk urea and rumen ammonia nitrogen concentrations and the association with nitrogen utilization and diet digestibility in lactating cows. *J Dairy Sci.* 98(5):3182-3196.

Hultgren, J., Bergsten, C., Manske, T., 1998. Claw trimming routines in relation to herd size and housing: a survey in Swedish dairy herds. In: Lischer, C.J., Ossent, P. (Eds.), *Proceedings of the 10th International Symposium on Lameness Ruminants*, Lucerne, Switzerland, 7–10 September 1998, 26–27.

Jungi TW, Farhat K, Burgener IA, Werling D. 2011. Toll-like receptors in domestic animals. *Cell and Tissue Research.* 343: 107–120.

Kato K, Mori K, Kato N. 1989. Contribution of leucocytes to the origin of lactate dehydrogenase isozymes in milk of bovine mastitis. *The Japanese journal of veterinary science* 51(3):530.

Kehrli ME Jr. and D. E. Shuster. 1994. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 77, 2: 619–627.

Kelley KW, Weigent DA, Kooijmand R.2007. Protein hormones and immunity. *Brain Behav Immun.* 12, 4:384-392.

Kimbrell, D.A. and Beutler, B. 2001. The Evolution and Genetics of Innate Immunity. *Nature Reviews Genetics*, 2, 256-267

Kimura K., Goff P. and Kehrli ME. 1999. Effects of the presence of the mammary gland on expression of neutrophil adhesion molecules and myeloperoxidase activity in periparturient dairy cows. *J. dairy Sci.* 82: 2385-2392.

Kitchen BJ, Middleton G & Salmon M 1978 Bovine milk N-acetyl- β -Dglucosaminidase and its significance in the detection of abnormal udder secretions. *J. of Dairy Res.* 45: 15–20.

Kuhn NJ and White A 1975. Milk glucose as an index of the intracellular glucose concentration of rat mammary gland. *Biochemical Journal.* 152: 153–155.

Kumar H, Kawai T, Akira S. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology.* 30: 16–34.

Lamote I., E. Meyer, A. De Ketelaere, L. Duchateau, C. Burvenich.2006. Expression of the estrogen receptor in blood neutrophils of dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology.* 65, 6:1082-1098.

Larsen T, Nielsen NI. 2005. Fluorometric determination of beta-hydroxybutyrate in milk and blood plasma. *J Dairy Sci.*88:2004–2009.

Larsen T, Moyes KM. 2010. Fluorometric determination of uric acid in bovine milk. *J Dairy Res.*77 438–444.

Larsen T. 2015. Fluorometric determination of free glucose and glucose 6-phosphate in cows' milk and other opaque matrices. *Food Chem.*166:283–286.

Larsen T. 2014. Fluorometric determination of free and total isocitrate in bovine milk. *J Dairy Sci.*97:7498–7504.

Larsen T, Moyes KM. 2015. Are free glucose and glucose-6-phosphate in milk indicators of specific physiological states in the cow? *Animal.* 9,1: 86–93.

Laudanna C, Constantin G, Baron P. 1994.. Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. *J Biol Chem* .269:4021–4026.

LeBlanc S J, Lissemore KD, Kelton DF, TF Duffield and Leslie KE. 2006. Major advance in disease prevention in dairy cattle. *J dairy Sci*. 89:1267-1279.

LeBlanc. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J Reprod Dev*. 56, S29-35.

Lee, F. B. Wooding, and P. Kemp. 1980. Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows *J Dairy Res*. 47, 1: 39– 50.

Lee, M., Lee, H.J., Bae, S., Lee, Y.S., 2008. Protein sialylation by sialyltransferase involves radiation resistance. *Mol. Cancer Res*. 6, 1316–1325.

Lee PS, Sampath K, Karumanchi SA, Tamez H, Bhan I, Isakova T, Gutierrez OM, Wolf M, Chang Y, Stossel TP, Thadhani R.2009. Plasma gelsolin and circulating actin correlate with hemodialysis mortality. *J Am Soc Nephrol* .20:1140-1148.

Leonard W.J. 1999 in *Fundamental Immunology* (Paul, W.E. ed) 4^o edizione, , 741-774, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia

Lin, K.M., Wenegieme, E., Lu, P.J., Chen, C.S., and Yin, H.L. (1997). Gelsolin binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is modulated by calcium and pH. *J. Biol. Chem*. 272: 20443–20450.

Linn 1988. *Factors Affecting the Composition of Milk from Dairy Cows*. National Research Council (US) Committee on Technological Options to Improve the Nutritional Attributes of Animal Products. *Designing Foods: Animal Product Options in the Marketplace*. Washington (DC): National Academies Press (US)

Lippolis, J. D., BD Peterson-Burch, T. A. Reinhardt.2006. Differential expression analysis of proteins from neutrophils in the periparturient period and neutrophils from dexamethasone-treated dairy cows. *Vet.Immunol. Immunopathol.* 111:149-164.

Lu M, Witke W, Kwiatkowski DJ, Kosik KS.1997. Delayed retraction of filopodia in gelsolin null mice. *J Cell Biol.* 22;138(6):1279-87.

Luginbühl W. 2002. Evaluation of Designed Calibration Samples for Casein Calibration in Fourier Transform Infrared Analysis of Milk. *LWT - Food Science and Technology* 35, 554-558.

Kitchen, B. J. 1981. Bovine mastitis: Milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res.* 48:167.

Lumeng CN, Saltiel AR. 2011. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation* 121: 2111–2117.

Makarov, S. S., Johnston, W. N., Olsen, J. C., Watson, J. M., Mondal, K., Rinehart, C. et al. 1997 NF-kappa B as a target for anti-inflammatory gene therapy: suppression of inflammatory responses in monocytic and stromal cells by stable gene transfer of I kappa B alpha cDNA. *Gene Ther* 4: 846-852.

Malek dos Reis CB, Barreiro JR, Mestieri L, Porcionato MAF, dos Santos MV.2013. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. *BMC Vet Res.* 9:67.

Mallard BA, J.C. Dekkers, M.J. Ireland, K.E .Leslie, S. Sharif, C.L Vankampen, L. Wagter, B.N. Wilkie. 1998. Alteration in Immune Responsiveness During the Peripartum Period and Its Ramification on Dairy Cow and Calf Health. *J Dairy Sci.* 81, 2: 585-595.

Mazur, A.J., Gremm, D., Dansranjavin, T., Litwin, M., Jockusch, B.M., Wegner, A., Weeds, A.G., and Mannherz, H.G. 2010. Modulation of actin filament dynamics by actin-binding proteins residing in lamellipodia. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 402–413.

McPherson A.V., Kitchen B.J. 1983. Review of the progress of dairy science. The bovine milk fat globule membrane – its information, composition, structure and behavior in milk and dairy products. *J Dairy Res.* 50, 10.

Miller RM, J. Bitman, S. A. Bright, D. L. Wood, and A. V. Capuco. 1992. Effect of clinical and subclinical mastitis on lipid composition of teat canal keratin. *J Dairy Sci.* 75, 6:1436–1442.

Mitterhuemer S, Petzl W, Krebs S, Mehne D, Klanner A, Wolf E, Zerbe H, Blum H. 2010. *Escherichia coli* infection induces distinct local and systemic transcriptome responses in the mammary gland. *BMC Genomics.* 11:138.

Moyes KM, Drackley JK, Morin DE, Bionaz M, Rodriguez-Zas SL, Everts RE, Lewin HA, Looor JJ. 2009. Gene network and pathway analysis of bovine mammary tissue challenged with *Streptococcus uberis* reveals induction of cell proliferation and inhibition of PPAR γ signaling as potential mechanism for the negative relationships between immune response and lipid metabolism. *BMC Genomics.*;10:542

Moyes KM, Drackley JK, Morin DE, Rodriguez-Zas ZL, Everts RE, Lewin HA, Looor JJ. 2010. Mammary gene expression profiles during an intramammary challenge reveal potential mechanisms linking negative energy balance with impaired immune response. *Physiol Genomics.* 41:161–170.

Moyes KM, Larsen T, Peter Sørensen P, Ingvarstsen KL. 2014. Changes in various metabolic parameters in blood and milk during experimental *Escherichia coli* mastitis for primiparous Holstein dairy cow during early lactation. *J Anim Sci Biotechnol.* 5:47.

Moyes KM, Sorensen P, Bionaz M. 2016. The Impact of Intramammary *Escherichia coli* Challenge on Liver and Mammary Transcriptome and Cross-Talk in Dairy Cows during Early lactation Using RNAseq. *Plosone.*

Nguyen, D.-A.D., and Neville, Margaret C. 1998. Tight Junction Regulation in the Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* 3(3): 233-246.

Nickerson SC. 1985. Immune mechanisms of the bovine udder: an overview. *J. American Vet Med Association,* 187, 1: 41–45.

Nicola NA. 1994. Cytokine pleiotropy and redundancy: a view from the receptor. *Stem Cells.*; 12 S1:3.

Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2008a. Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 513–533.

Nousiainen J, Shingfield KJ, Huhtanen P. 2004. Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feeding. *J Dairy Sci.* 87:386–398

Nonnecke B., Kimura K., Goff JP., and Kehrl ME. 2003. Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from pariparturient cows. *J. Dairy Sci.* 86: 2359-2368.

Ochoa-Zarzosa A, E Villarreal-Fernández, H Cano-Camacho, J E.López-Meza. 2009. Sodium butyrate inhibits *Staphylococcus aureus* internalization in bovine mammary epithelial cells and induces the expression of antimicrobial peptide genes. *Microbial Pathogenesis* 47, Issue 1, 1-7.

Oetzel GR . 2004. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 20: 651–674.

Oltenu P.A. and Broom D.M. 2010. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Animal Welfare* 19, 39-49.

Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. 2010. Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *J Dairy Sci.* 93:546–554.

Ostdal H, Andersen HJ, Nielsen JH. 2000. Antioxidative activity of urate in bovine milk. *J Agric Food Chem.* 48(11):88-92.

Paulrud CO. Basic concepts of the bovine teat canal. 2005. *Vet Res Communications*, 29, 3: 215–245.

Pighetti, G.M. and Elliott, A.A. 2011. Gene Polymorphisms: The Keys for Marker Assisted Selection and Unraveling Core Regulatory Pathways for Mastitis Resistance. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16, 421-432.

Pinte S, Caetano B, Le Brasa A, Haveta C, Villaina G, Dernayka R, Duez C, Mattot V, Soncina F. 2016. Endothelial cell activation is regulated by Epidermal growth factor-like domain 7 (Egfl7) during inflammation. *J Biol Chem*;291: 417-428.

Pinedo P. J, A. De Vries and D. W. Webb. 2010. Dynamics of culling risk with disposal codes reported by Dairy Herd Improvement dairy herds. *J. Dairy Sci.* 93 :2250–2261.

Peaker, M., and A. Faulkner. 1983. Soluble milk constituents. *Proc. Nutr. Soc.* 42:419.

Peter, A. T., Clark, P.W., van Roekel, D.E., Luker, C.W., Gaines, J.D. and Bosu, W.T. 1990. Temporal changes in metabolites of prostanoids in milk of heifers after intramammary infusion of *Escherichia coli* organisms. *Prostaglandins* 39:451–457.

Pyörälä S, Hovinen M, Simojoki H, Fitzpatrick J, Eckersall PD, Orro 2011.T. Acute phase proteins in naturally acquired mastitis caused by different pathogens. *Veterinary Record*.168:535–540.

Pyorala, S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*, 2003. 34(5): 565-578.

Pulina, G., A. Nudda, N.P.P. Macciotta, G. Battaccone, S.P.G. Rattu, e A. Cannas. 2007. Non nutritional factors affecting lactation persistency in dairy ewes: A Review. *Italian Journal of Animal Science* 6, 83-103.

Randolph HE. 1974. Influence of Mastitis on Properties of Milk. X. Fatty Acid Composition 1. *J Dairy Sci.* 57,8: 865-868.

M. Rinaldi, R. W. Li, D. D. Bannerman et al., “A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. 2010. *Functional & Integrative Genomics*.10, 1: 21–38.

Rutten M.J.M, Bovenhuis H., Hettinga K.A., van Valenberg H.J.F. van Arendonk J.A.M. 2009. Predicting bovine milk fat composition using infrared spectroscopy based on milk samples collected in winter and summer. *J Dairy Sci.* 92, 6202–6209.

Rutten CJ , A. G. J. Velthuis, W. Steeneveld and H. Hogeveen. 2013. Sensors to support health management on dairy farms *J Dairy Sci.* 96, 4.

Rzewuska K and Strabel T. 2013. Genetic parameters for milk urea concentration and milk traits in Polish Holstein-Friesian cows. *J Appl Genet.* 54(4):473–482.

Salvadori del Prato, O. 1998. *Trattato di tecnologia casearia.* Edagricole (Ed.), Bologna.

Safiejko-Mrocicka B, Bell PB Jr. 2001. Reorganization of the actin cytoskeleton in the protruding lamellae of human fibroblasts *Cell Motil Cytoskeleton.* 50(1):13-32.

Schmittgen and Zakrajsek, 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR, *J Biochemical and Biophysical Methods*, 46, Issues 1–2: 69-81.

Schukken, Y.H., Gunther, J., Fitzpatrick, J., Fontaine, M.C., Goetze, L. 2011. Host-Response Patterns of Intramammary Infections in Dairy Cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144, 270-289.

Schultz, L. H. 1977. Somatic cell in milk—physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. *J. Food Prot.* 40:125.

Schwartz, S. A., Hernandez, A., and Mark, E. B. 1999. The role of NF κ B/I κ B proteins in cancer: implications for novel treatment strategies. *Surg Oncol* 8: 143-153.

Secchiari PL. 2008. Aspetti del valore nutrizionale e nutraceutico degli alimenti di origine animale. *Ital. J. Agron. / Riv. Agron.*, 3:73-101.

Selvey, S., Thompson, E. W., Matthaei, K., Lea, R. A., Irving, M. G., and Griffiths, L. R. 2001. Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR. *Mol Cell Probes* 15: 307-311.

Serhan, A. Jain, S. Marleau, C. Clish, A. Kantarci, B., Behbehani, S.P. Colgan, G.L. Stahl, A. Merched, N.A. Petasis, L.Chan, T.E. Van Dyke. 2003. Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators, *J. Immunol.* 171:6856–6865.

Shi X, Li X, Li D, Li Y, Song Y, Deng Q, Wang J, Zhang Y, Ding H, Yin L, Wang Z, Liu G. 2014. β -hydroxybutyrate activates the NF-kappaB signaling pathway to promote the expression of pro-inflammatory factors in calf hepatocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology. Biochemical Pharmacology* 33, 920–932

Shuster, D.E. 1991. Suppression of Milk Production During Endotoxin-Induced Mastitis. *J. Dairy Sci.* 74(11): 3763-3774.

Shuster, D. E., E. K. Lee, and M. E. Jr., Kehrl. 1996. Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation. *Am. J. Vet. Res.* 57:1569-1575.

Signorelli F, Cifuni GF, Miarelli. 2012. Differentially expressed mammary proteins during lactation in dairy sheep. *Livest Sci.* 149:224–231.

Silvestre FT, Carvalho TS, Crawford PC, Santos JE, Staples CR, Jenkins T, Thatcher WW. 2011. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: II. Neutrophil fatty acids and function, and acute phase proteins. *J Dairy Sci.* 94: 2285–2301.

Singh K, S. R. Davis, J. M. Dobson. 2008. cDNA microarray analysis reveals that antioxidant and immune genes are upregulated during involution of the bovine mammary gland,” *J Dairy Sci*, 91, 6: 2236–2246.

Simon SI, Burns AR, Taylor AD, 1995. L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18) beta 2-integrin. *J Immunol*;155:1502–1514

Smoczynsky M, Staniewski B, Kielczewska K. 2012. Composition and Structure of the Bovine Milk Fat Globule Membrane, Some Nutritional and Technological Implications. *Food Rev Int.*;28:188–202.

Smolenski GA, Broadhurst MK, Stelwagen K, Haigh BJ, Wheeler TT. 2014. Host defence related responses in bovine milk during an experimentally induced *Streptococcus uberis* infection. *Proteome Sci.*;12:19.

Song M, Yanghua H, Zhou H, Zhang Y, Li X, Yu Y. 2016. Combined analysis of DNA methylome and transcriptome reveal novel candidate genes with susceptibility to bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Sci Rep*. DOI: 0.1038/srep29390

Sordillo LM, K. Shafer-Weaver, and D. DeRosa.1997. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci*, 80, 8: 1851–1865.

Sordillo LM and K. L. Streicher. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility,” *J Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7, 2: 135–146.

Sordillo LM, GA Contreras and S LAitken. 2009. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim Health Res Reviews*, 100 (1), 53-63.

Sordillo LM and Raphael W. 2013. Significance of Metabolic Stress, Lipid Mobilization, and Inflammation on Transition Cow Disorders. *Vet Clin Food Anim*, 29, 267-278.

Sordillo LM and Mavagira. 2014. The nexus between nutrient metabolism, oxidative stress and inflammation in transition cows. *Ani Prod Sci*. 54:1204-1214.

Sordillo LM. 2016. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. *J Dairy Sci*. 99(6):4967-4982.

Soyeurt, H., D. Bruwier, J.-M. Romnee, N. Gengler, C. Bertozzi, D. Veselko, and P. Dardenne. 2009. Potential estimation of major mineral contents in cow milk using mid-infrared spectrometry. *J. Dairy Sci*. 92:2444–2454

- Soyeurt H., F. Dehareng ,N. Gengler , S. McParland , E. Wall , D. P. Berry , M. Coffey and P. Dardenne. 2011. Mid-infrared prediction of bovine milk fatty acids across multiple breeds, production systems, and countries. *J. Dairy Sci.* 94:1657–1667.
- Sprague AH and Khalili RA. 2009. Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease. *Biochem Pharmacol.* 15; 78(6): 539–552.
- Stöckmann, H., B. Adamczyk, J. Hayes, and P. M. Rudd. 2013. Automated, High-Throughput IgG-Antibody Glycoprofiling Platform. *Analytical Chemistry.* 85(18):8841-8849.
- Stelwagen K, E. Carpenter, B. Haigh, A. Hodgkinson, and T. T. Wheeler. 2009. Immune components of bovine colostrum and milk. *J Animal Sci.* 87, 13: 3–9.
- Sun, H.Q., Kwiatkowska, K., Wooten, D.C., and Yin, H.L. (1995). Effects of CapG overexpression on agonist-induced motility and second messenger generation. *J. Cell Biol.* 129, 147–156.
- Sudhan N. and N. Sharma. 2010. Mastitis- an important production disease of dairy animals,” in Gurgoan: Sarva Manav Vikash Samiti, pp. 72–88, 2010.
- Summer A., Franceschi P., Malacarne M., Formaggioni P., Tosi F., Tedeschi G., and Mariani P. 2009. Influence of somatic cell count on mineral content and salt equilibria of milk. *Ital. J. Anim. Sci.* 8:435-437.
- Sundrum A. 2015. Metabolic Disorders in the Transition Period Indicate that the Dairy Cows’ Ability to Adapt is Overstressed. *Animals (Basel).* 5(4):978-1020.
- Suriyasathaporn W, Heuer C, Noordhuizen-Stassen EN, Schukken YH. 2000. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. *Veterinary Research* 31, 397–412
- Swindall, A.F., Bellis, S.L., 2011. Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 286, 22982–22990

Tallamy, P. T., and H. E. Randolph. 1970. Influence of mastitis on properties of milk. V. Total and free concentrations of major minerals in skim milk. *J. Dairy Sci.* 53:1386.

Taron CH, Rudd PM. 2016. Glycomics: A rapidly evolving field with a sweet future. feature article, *biolabs* 2016, www.neb.com

Tas BM, Susenbeth A. 2007. Urinary purine derivatives excretion as an indicator of in vivo microbial N flow in cattle : A review. *Livest. Sci.* 111:181–192.

Taylor BC, J. D. Dellinger, J. S. Cullor, and J. L. Stott. 1994. Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+. *Cellular Immunology*, 156, 1: 245–253.

Tei, K., Kawakami-Kimura, N., Taguchi, O., Kumamoto, K., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Toda, K., Kawata, R., Hisa, Y., Kannagi, R., 2002. Roles of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis induced by cotransplantation of cancer and endothelial cells to nude rats. *Cancer Res.* 62, 6289–6296.

Trevisi E., Amadori M., Archetti I., Lacetera N., Bertoni G., 2011. Inflammatory response and acute phase proteins in the transition period of high-yielding dairy cows. In: “Acute Phase Protein / Book 2” Ed. F. Veas, InTech Rijeka, Croatia; Pp 355-380.

Trevisi E, Amadori M, Cogrossi S, Razzuoli E, Bertoni G. 2012. Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Research in Veterinary Science* 93, 695–704

Uthaisangsook S., N. K. Day, S. L. Bahna, R. A. Good, and S. Haraguchi. 2002. Innate immunity and its role against infections. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology.* 88, 3: 253–264.

Vandesompele, J., De, P. K., Pattyn, F., Poppe, B., Van, R. N., De, P. A. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034.

van der Drift, S. G. A., R. Jorritsma, J. T. Schonewille, H. M. Knijn, and J. A. Stegeman. 2012. Routine detection of hyperketonemia in dairy cows using Fourier transform infrared spectroscopy

analysis of β -hydroxybutyrate and acetone in milk in combination with test-day information. *J. Dairy Sci.* 95:4886–4898.

van Kneegsel, A. T. M., S. G. A. van der Drift, M. Horneman, A. P. W. de Roos, B. Kemp, and E. A. M. Graat. 2010. Short communication: Ketone body concentration in milk determined by Fourier transform infrared spectroscopy: Value for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:3065–3069.

Van Kneegsel ATM, H M. Hammon, U Bernabucci, G Bertoni, RM. Bruckmaier, R M.A. Goselink, JJ. Gross, B Kuhla, C C. Metges, HK. Parmentier, E Trevisi, A Troscher and AM. van Vuuren, 2014.CAB reviewers.9: n2

Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T. 2014. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front Immunol.* 5:520.

Viguiier C, S Arora, N Gilmartin, K Welbeck and R O’Kennedy. 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology* .27,8.

Villarroel A., 2017.Using conductivity for early mastitis detection. *Progressive Dairyman*.

Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A.R.J., Fonseca, A.J.M., Dewhurst, R.J., 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131, 389–417.

Walstra, P., Jenness R. (1984). *Dairy chemistry and physics*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.

Weber L, E. Peterhans and R. Wyler. 1983. The chemiluminescent response of bovine polymorphonuclear leucocytes isolated from milk and blood. *Vet Immun and Immunopath*, 4, 3: 397–412, 1983.

Weber PSD, Madsen SA, Smith GW, Ireland JJ, Burton JL. 2001. Pretranslational regulation of neutrophil l-selectin in glucocorticoid-challenged cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 83:213-240.

- Whelehan CJ, K. G. Meade, P. D. Eckersall, F. J. Young, and C. O'Farrelly. 2011. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Vet Immun and Immunopath.* 140, 3-4: 181–189.
- Williams, K.O. and Higgs, G.A. 1988. Eicosanoids and inflammation. *The Journal of Pathology* 156: 101-110.
- Witke W, Sharpe AH, Hartwig JH, Azuma T, Stossel TP, Kwiatkowski DJ. 1995. Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin. *Cell.*81:41–51.
- Wittwer, J., and M. Hersberger. 2007. The two faces of the 15-lipoxygenase in atherosclerosis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 77:67–77.
- Wood D, S. Bright, A. Capuco, P. Grier, R. Miller, and J. Bitman. 1990. The effect of clinical mastitis on lipid composition of teat canal keratin and milk. *J Dairy Sci*, 73, supplement 1: 213.
- Xue J, Zhu L-P, Wei Q. IgG-Fc N-glycosylation at Asn297 and IgA O-glycosylation in the hinge region in health and disease. *Glycoconj J.* 2013;30:735–745
- Zanabria R, Tellez A M, Griffiths M, Sharif S, Corredig M. 2016. Modulation of immune function by milk fat globule membrane isolates. *J Dairy Sci.*;97 :2017–2026
- Zecconi A, J. Hamanno, V. Bronzo, P. Moroni, G. Giovannini, R. Piccinini. 2002. Relationship between teat tissue immune defences and intramammary infections. *Biology of the Mammary Gland*, 287–293, Springer, New York, NY, USA.
- Zipser, R.D. and Laffi, G. 1985. Prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes in clinical medicine. *West J. Med.* 143: 485-497.