

Immunità e periparto: sviluppo di indicatori di rischio in asciutta e nel periparto

Massimo Amadori

Laboratory of Cellular Immunology - IZSLER - Brescia

- 📄 **Cornice concettuale**
- 📄 **Fondamenti**
- 📄 **Compiti attuali**
- 📄 **Ripercussioni**



Profilassi nel 20° e 21° secolo

20° secolo:

 Quantità

 Industrializzazione



 Chemioprolifassi
(antibiotici)

21° secolo

 Qualità

 Benessere animale



 Stimolazione del sistema
immunitario innato

 Selezione per resistenza
alle malattie

Fenotipi animali attuali: bovina da latte ad elevata produzione, potenziale $\geq 10,000$ kg/lattazione



Chiara correlazione con chetosi, mastite e zoppie (Ingvartsen et al., 2003). Tassi di rimonta $>30\%$ a causa di malattie da produzione.

Quali fenotipi animali ?

Italia 2010: su 651.489 lattazioni di bovine Frisone media di 9.075 kg, con contenuto medio pari a 3.64% e 3.31%, rispettivamente per grasso e proteina.

L'aumento del potenziale genetico a produrre latte aumenta l'incidenza delle malattie da produzione e la fertilità, i meccanismi biologici sottostanti sono solo in parte noti (Oltenacu and Broom, 2010).

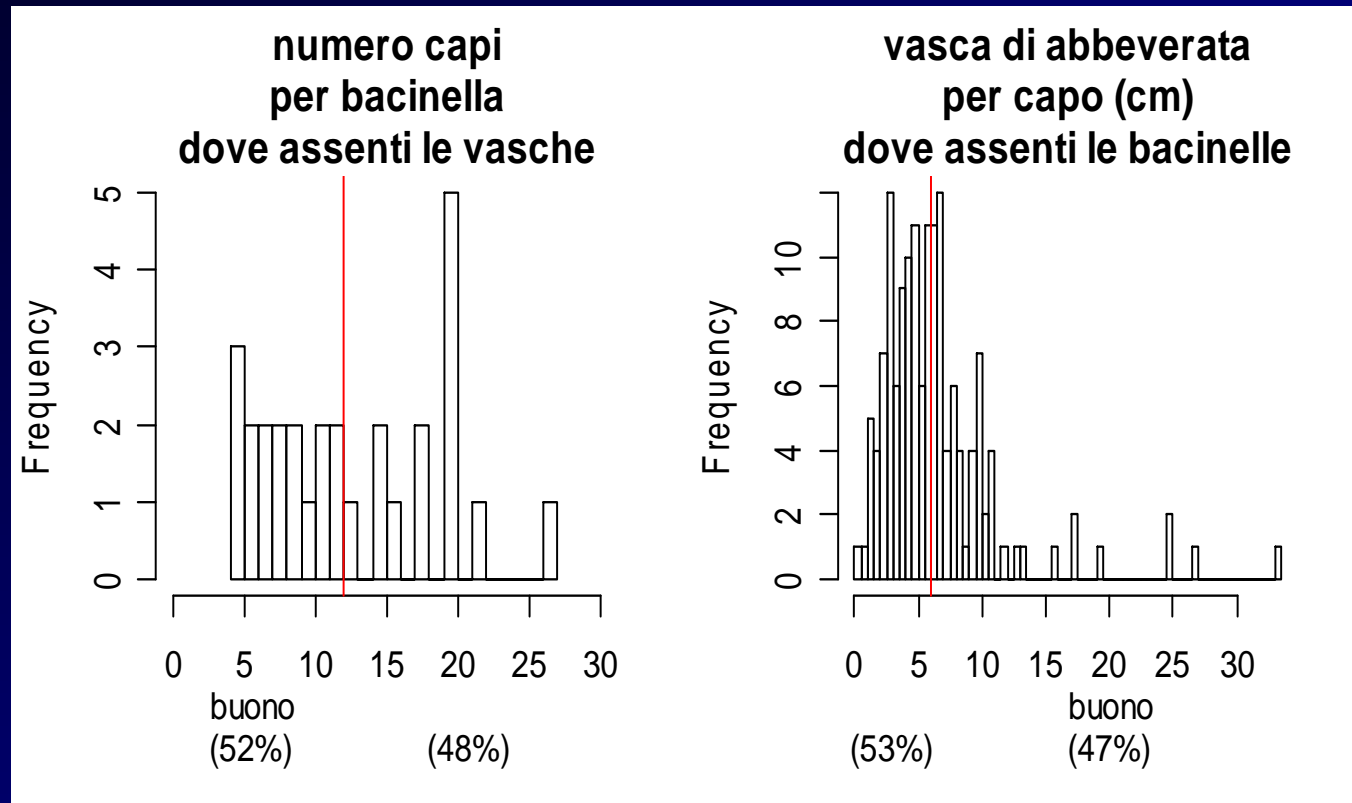
Bovine vive in N-E USA a 48 mesi di vita da 80% nel 1957 al 13% nel 2002; stesse aziende e periodo: intervallo interparto da 13 a 15,5 mesi (Oltenacu and Broom, 2010).



Genetica animale e adattamento ambientale

- 📄 Animali con ridotta capacità di adattamento all'ambiente
- 📄 Aspetti logistici ed organizzativi aziendali spesso non adeguati a tali fenotipi animali

Adeguatezza delle aziende alle bovine ad alta produzione (1): 231 aziende MI/LO/PV/CR 1° fase di lattazione (0-100 giorni). Dati di 222 aziende.



1 bacinella/12 capi. 6 cm vasca / capo.

**Dati 2007 progetto MINSAL
PRC2003001**

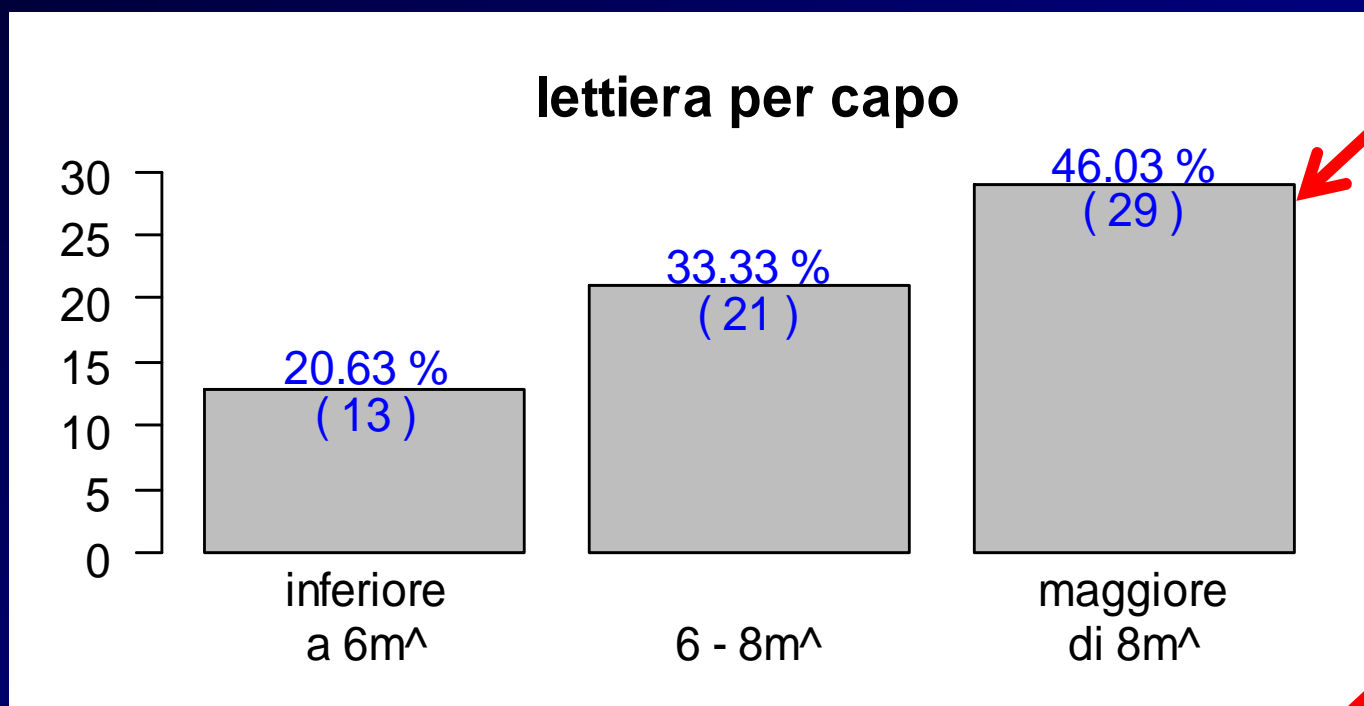
IZSLER Brescia



Adeguatezza delle aziende alle bovine ad alta produzione (2): bovine in asciutta

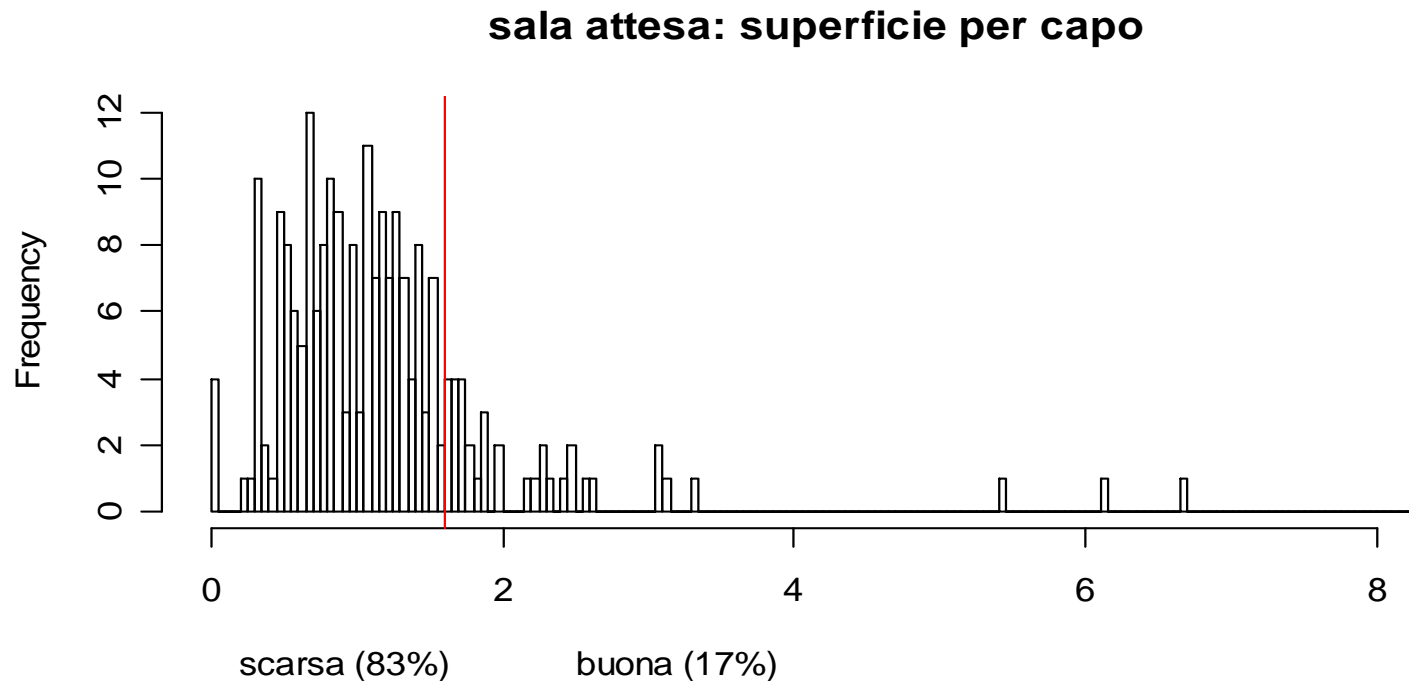
Dati di 63 allevamenti

Stato delle aree di riposo



Rinnovo completo lettiera < 1 mese: 44%

Adeguatezza delle aziende alle bovine ad alta produzione (3): sala di attesa. Dati di 231 aziende.



Parametro: almeno 1,6 m² / capo



Quale risposta delle bovine allo stress produttivo ?

Risposta / modulazione infiammatoria, pur in assenza di infezioni microbiche

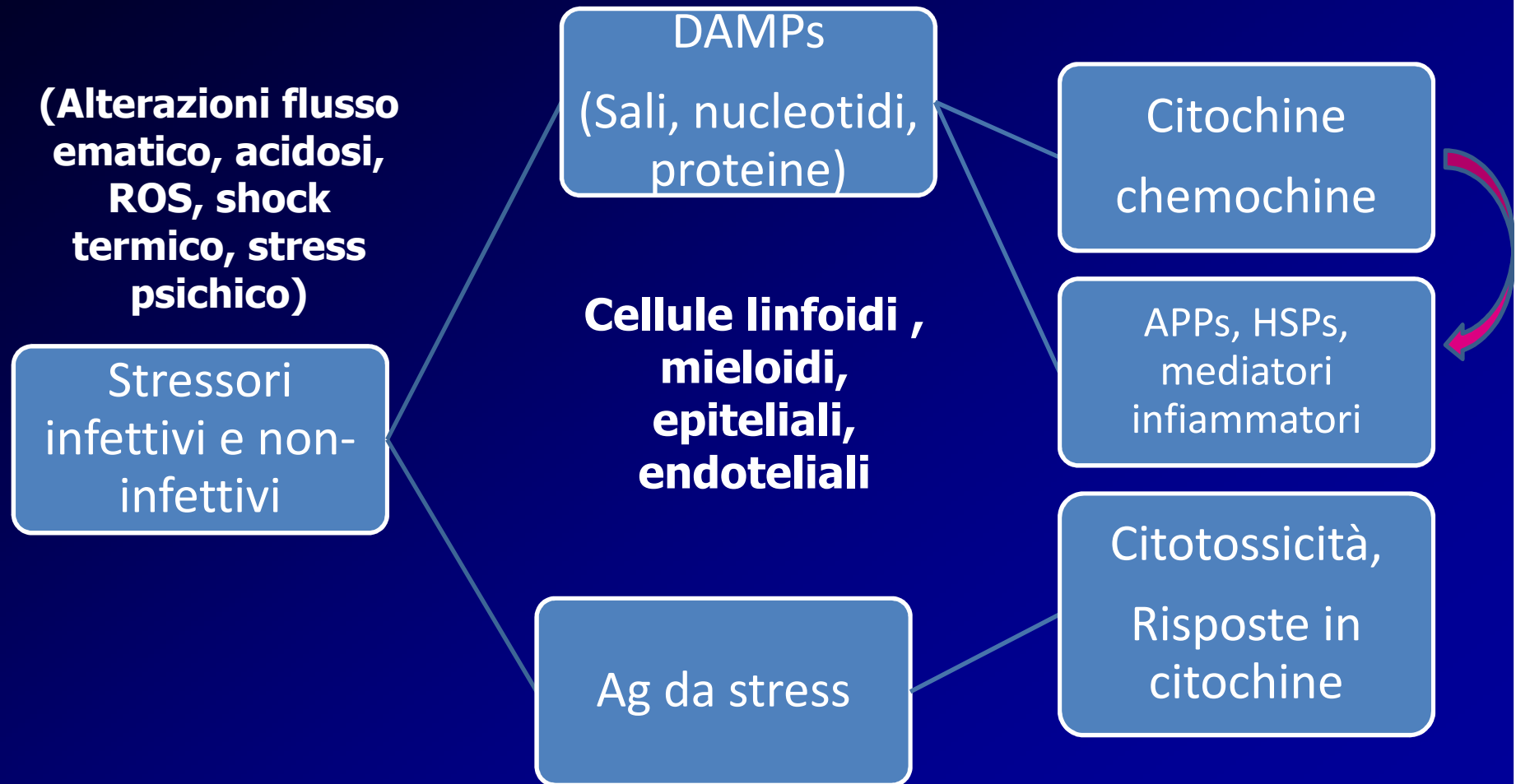
Aspetti principali: inversione della formula leucocitaria, monocitosi, alterazione del rapporto A/G, risposta di fase acuta positiva (aptoglobina, ceruloplasmina) e negativa (albumina, proteine di trasporto vit A e colesterolo, paraoxonasi), bilirubina, citochine infiammatorie (IL-6, IL-1 beta), proteine HSP, ROMs.

Finalità: attuare un **intervento protettivo** contro *noxae* per restaurare l'omeostasi dell'ospite.

Bilancio energetico negativo quale causa cruciale di risposta infiammatoria e immunosoppressiva

- ☞ Chiari aspetti di immunosoppressione con NEB: ridotta concentrazione L-glutamina, glucosio / corpi chetonici / NEFA / bassi livelli di Ca (Ingvartsen , Moyes, 2013).
- ☞ Chemiotassi / diapedesisi / risposta ossidativa dei PMN/ proliferazione linfocitaria/ secrezione di IgM / produzione di citochine / vitalità cellulare / presentazione di antigeni.

Come spiegare l'influsso del metabolismo sui parametri immunitari: stressori infettivi e non infettivi



Relazione tra stress ossidativo e risposta infiammatoria

Stress ossidativo  **infiammazione**

La risposta infiammatoria stimola lo stress ossidativo e lo stress ossidativo stimola la risposta infiammatoria: circolo vizioso

Vedi ad esempio la stimolazione reciproca :

peroxiredoxina-2  **TNF- α**

Alterata omeostasi della risposta immunitaria adattativa

In presenza di stress ossidativo c'è una alterata omeostasi delle popolazioni di linfociti T che organizzano e coordinano la risposta immunitaria specifica

Cellule Th2 (difesa anti-parassitaria) e Th17 (difesa anti-batteri extracellulari, pro-infiammatorie) sono favorite.

Cellule Th1 (difesa anti-virale, anti-batteri intracellulari) e Treg (regolatorie, anti-infiammatorie) sono inibite.

Diagramma di flusso del rischio conseguente a immunosoppressione



Lo squilibrio fisiologico

Physiological Imbalance (PI) , a situation where the regulatory mechanisms are insufficient for the animals to function optimally leading to a high risk of a complex of digestive, metabolic and infectious problems.

(Ingvartsen KL, Moyes K, 2013. *Animal*, 7 Suppl 1: 112-122).



E' possibile individuare precocemente le bovine «problema» destinate a sviluppare patologie nel periparto ?

E' possibile sulla base di parametri flogistici, espressione di risposta immunitaria innata a stressori non-infettivi.

Pertanto, una espressione a livelli abnormi in fasi particolari del periparto indica una condizione di rischio sanitario e di eliminazione precoce dalla mandria.

Nel quadro deficit obiettivabili della risposta immunitaria, i parametri di cui sopra indicano una incapacità dell'animale di controllare adeguatamente le risposte flogistiche.

Sviluppo di algoritmi di rischio sanitario (Bertoni – Trevisi, 2001-2015)

Liver Activity Index (LAI): combinazione di 3 diversi parametri di risposta di fase acuta negativa (nAPP), 1° mese di lattazione.

Liver Functionality Index (LFI): 2 parametri di nAPP + bilirubina, 1° mese di lattazione.

Post-calving Inflammatory Response Index (PIRI): aptoglobina, colesterolo e paraoxonasi, stress ossidativo (ROMs). 1a settimana post parto.

Campioni a 3-7 e 28-30 giorni dopo il parto.

Anticipo dei trattamenti per migliori condizioni di sanità e benessere animale.



Dati disponibili (Bertoni – Trevisi)

**Incremento di proteine di fase acuta positiva
(aptoglobina, ceruloplasmina)**

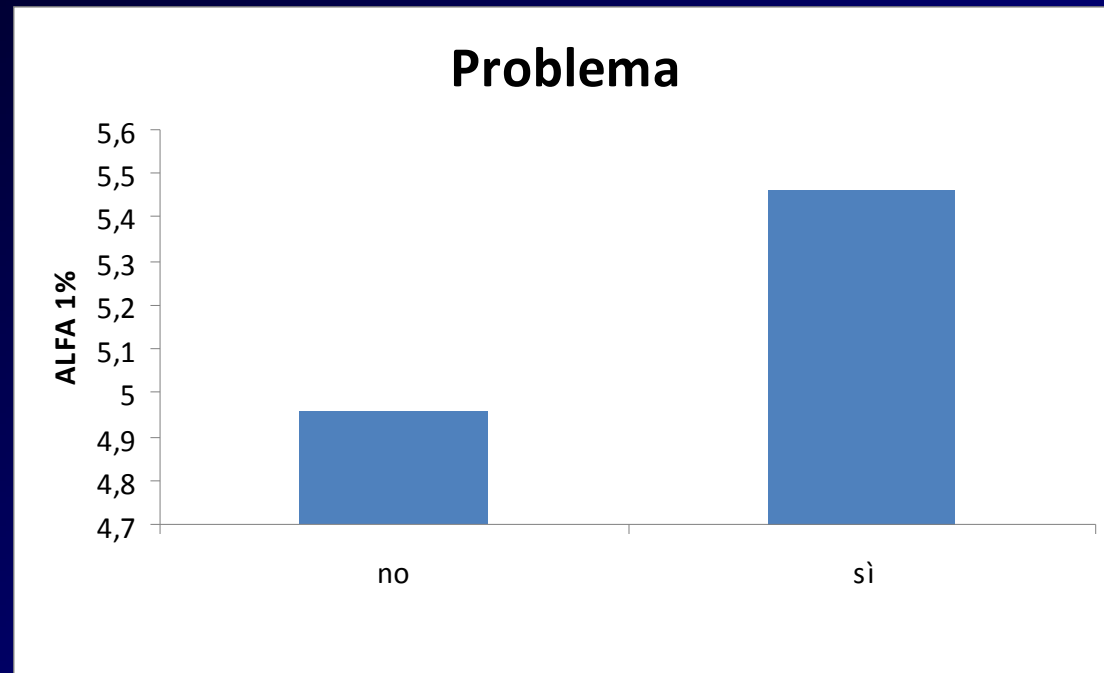
**Decremento di proteine di fase acuta negativa
(albumina, proteine di trasporto di colesterolo,
vitamina A, paraoxonasi)**

**Incremento dei metaboliti reattivi dell'ossigeno
(ROMs, stress ossidativo)**

Incremento della bilirubina

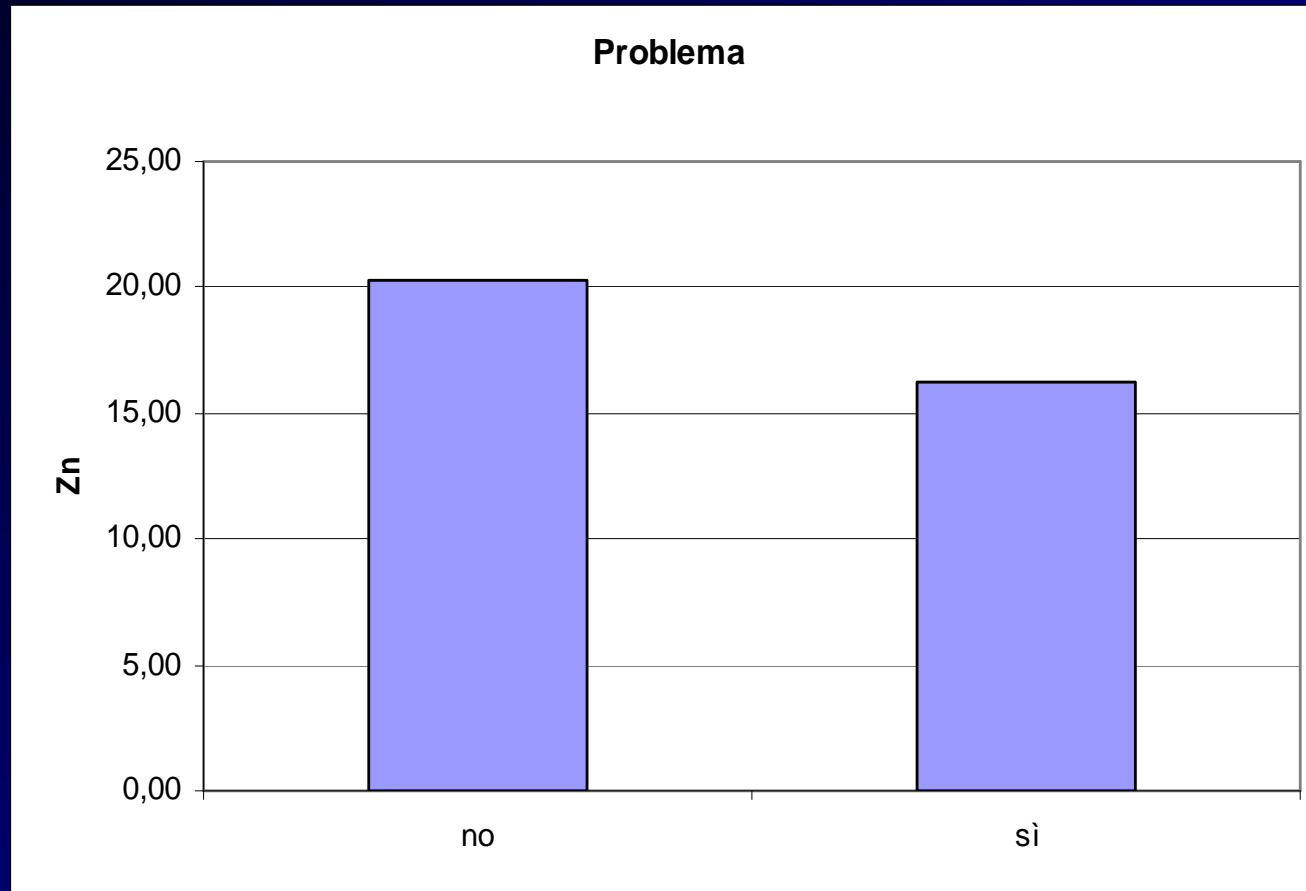
**Incremento di citochine infiammatorie (IL-6 e IL-
1 beta)**

α 1-globuline e malattie nel periparto ($P < 0.05$)



Stefani A. et al, IZSVE, 2010

Zinco (micromol/L) e malattie nel periparto ($P < 0.01$)



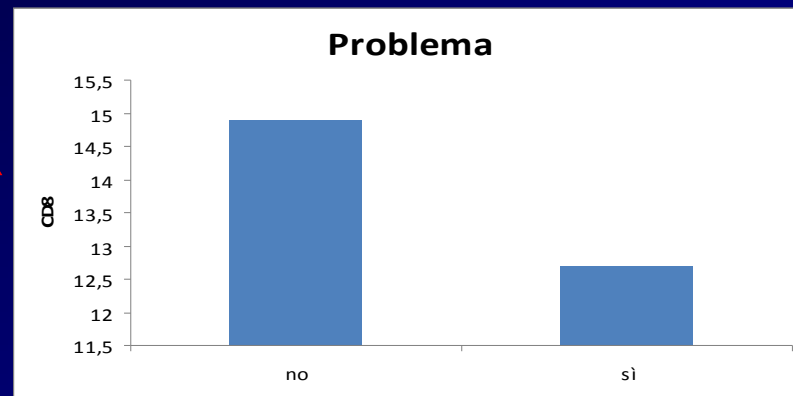
Stefani A. et al, IZSVE, 2010

Altri parametri correlati allo stato sanitario nel periparto

**Indice di blastizzazione linfocitaria a LPS batterico
(Catalani et al., 2013)**

**Frequenza media di linfociti T CD8+ (Stefani A. et al.,
2010)**



$P < 0,05$



Alti livelli di aptoglobina nella 2° settimana post parto

Minore assunzione di sostanza secca e produzione di latte

Risultati clinici (Trevisi et al., 2014)

-  **Bovine con basso LFI: molti più casi di malattia nel primo mese post parto (13 contro 3 in bovine ad alto LFI)**
-  **Bovine a basso LFI: molti più trattamenti farmacologici (190 contro 60 Euro/bovina ad alto LFI nel primo mese post parto)**

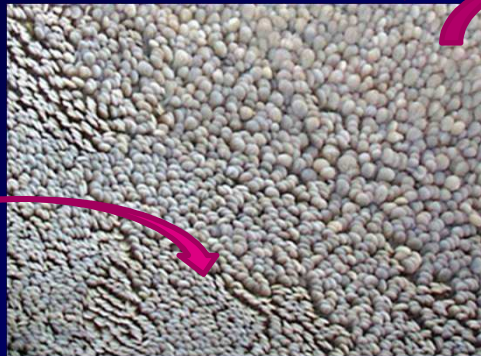
Liquido ruminale come matrice diagnostica

INGESTIONE

Metaboliti di fermentazioni anomale

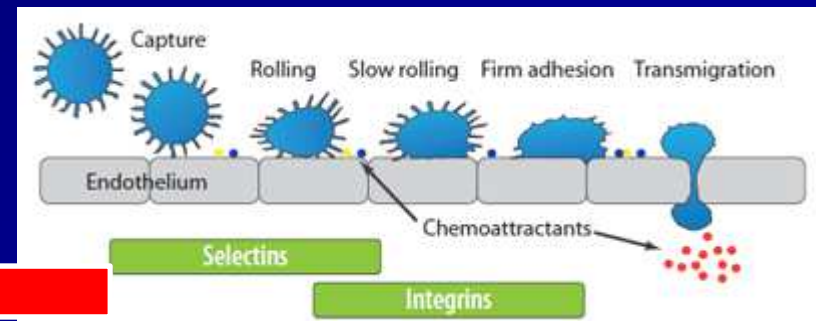
Leucociti da gh. sal.

Effetto inibente TIR-8 rimosso



Mediatori flogistici di patologie sistemiche

Fattori flogistici e chemiotattici (IL-1beta)



Amplificazione dei segnali flogistici a distanza: **LAMINITE ?**
IZSLER Brescia



Parametri diagnostici precoci e parametri predittivi

I parametri riportati consentono di **intervenire precocemente** su bovine destinate in gran parte a sviluppare patologie nel periparto.

Un sistema predittivo dovrebbe invece essere basato su **parametri valutati nel periodo di asciutta**

Fondamento logico: «imprinting» negativo sul sistema immunitario innato esercitato dai comuni stressori ambientali infettivi e, soprattutto, non-infettivi.

Quali stressori sono importanti in asciutta ?

Sfondo: frequenti condizioni di precario ricovero, bassi livelli di igiene zootecnica e scarsa attenzione in molte aziende.

Massiccia infiltrazione leucocitaria in mammella e rilascio di citochine infiammatorie dal tessuto adiposo e dalla placenta.

Edema mammario.

Deficit strutturali di controllo della risposta infiammatoria nella bovina Frisona: A) Lisozima,

B) Squilibrio tra risposta infiammatoria IL-1 β e NO.



Ruolo di lisozima nel controllo della risposta infiammatoria

In vitro, il lisozima a concentrazioni fisiologiche è in grado di inibire la risposta in citochine infiammatorie (TNF- α) dei leucociti bovini

Le bovine Frisone hanno concentrazioni di lisozima 5-10 volte inferiori a quelle di molte altre razze bovine



Concentrazione di lisozima e insorgenza di malattie
nel periparto (Trevisi et al., 2012)

**Bovine ad alta prevalenza di malattia nel
periparto (indice LFI basso, soggetti LO-LFI)
non hanno concentrazioni fisiologiche di
lisozima (1-3 $\mu\text{g}/\text{mL}$).**



Controllo della risposta infiammatoria in bovine Frisone e Brune (Werling et al., 2015)

IL-1beta è prodotta da macrofagi di bovine Frisone ma non Brune in risposta a *Listeria*.

Bovine Brune danno invece alti valori di NO e molto meno IL-1beta .

Inibizione di specie reattive dell'azoto (RNS) da L-arginasi ripristina produzione IL-1beta in bovine Brune.

Tuttavia, Killing batterico (*S. typhimurium*) è molto più efficiente in bovini Brune. Differenze di efficienza antibatterica non basate su numeri di macrofagi.

IL-1beta: parametro associato alle patologie del periparto !! (Trevisi et al., 2015).



Definizione di parametri predittivi in asciutta

Progetto Riprowell di MIPAAF, in collaborazione con L. Bertocchi e F. Fusi, IZSLER, Brescia.

80 bovine pluripare di 26 allevamenti

Prelievi di sangue in asciutta a T1 (giorni -23/-33) e T2 (giorni -2/-6)

Controllo dei casi di malattia nei primi 60 giorni di lattazione. Bovine sane (S) e malate (M), gravi o lievi.

Saggi di lisozima e IL-6 (vedi dati pregressi) + albumina, urea, BHBA, colesterolo totale, NEFA, C', SBA, aptoglobina.

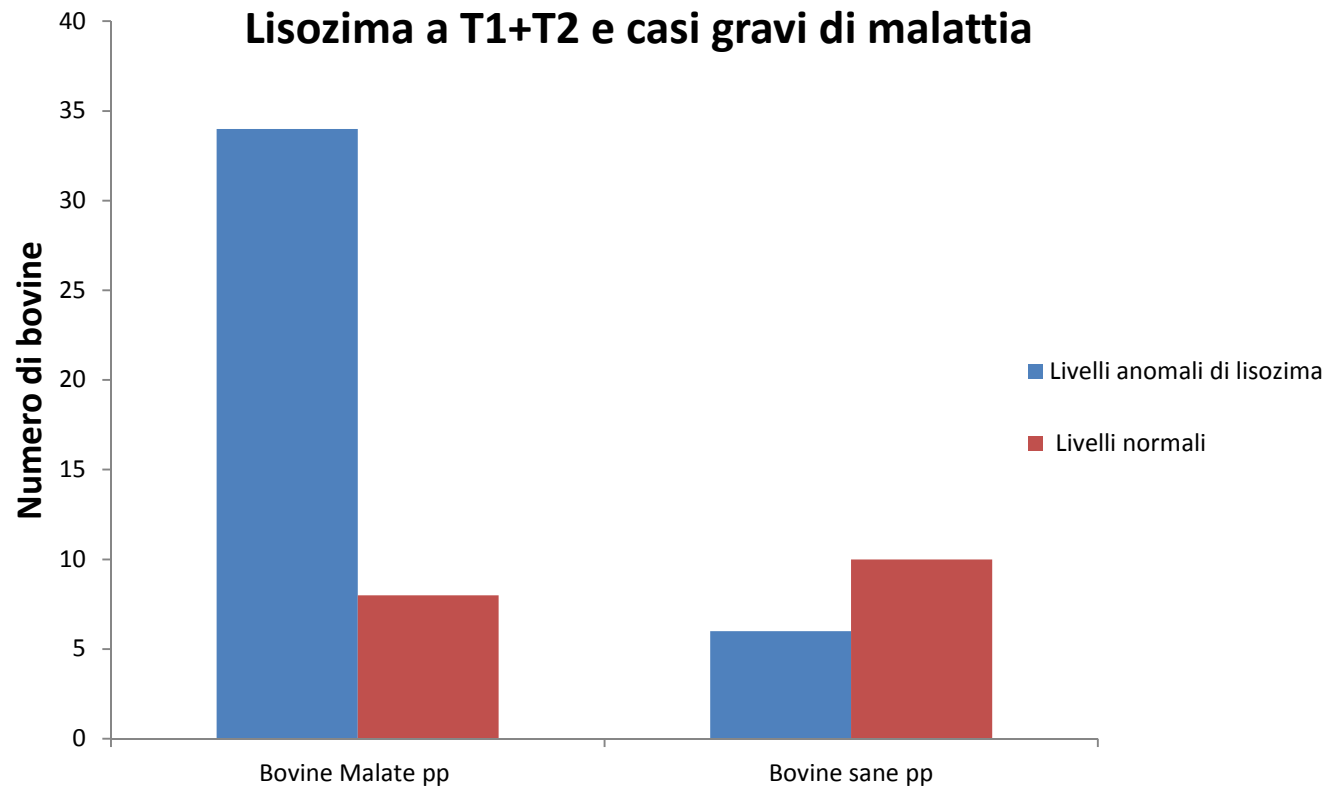
Valori di riferimento in asciutta

Parametro-Unità do misura	T1	T2
Albumina (g/L)	34 - 43	30 - 44
Urea (mmol/L)	2.62 - 4.27	2.95 - 4.50
BHBA (mmol/L)	0.25 - 0.42	0.33 - 0.51
Colesterolo totale (mmol/L)	1.79 - 2.43	1.56 - 2.35
NEFA (mmol/L)	0.08 - 0.36	0.2 - 0.54
Complemento (C'H ₅₀ /150 µL)		> 30
SBA (%)		> 90
Aptoglobina (mg/mL)		< 0.1
Lisozima (µg/mL)		1 - 3
IL-6 (pg/mL)		< 160

Bovine con valori all'interno dell'intervallo di riferimento: bovine normali (N). Bovine con valori fuori da tale intervallo: bovine «responder» (R).



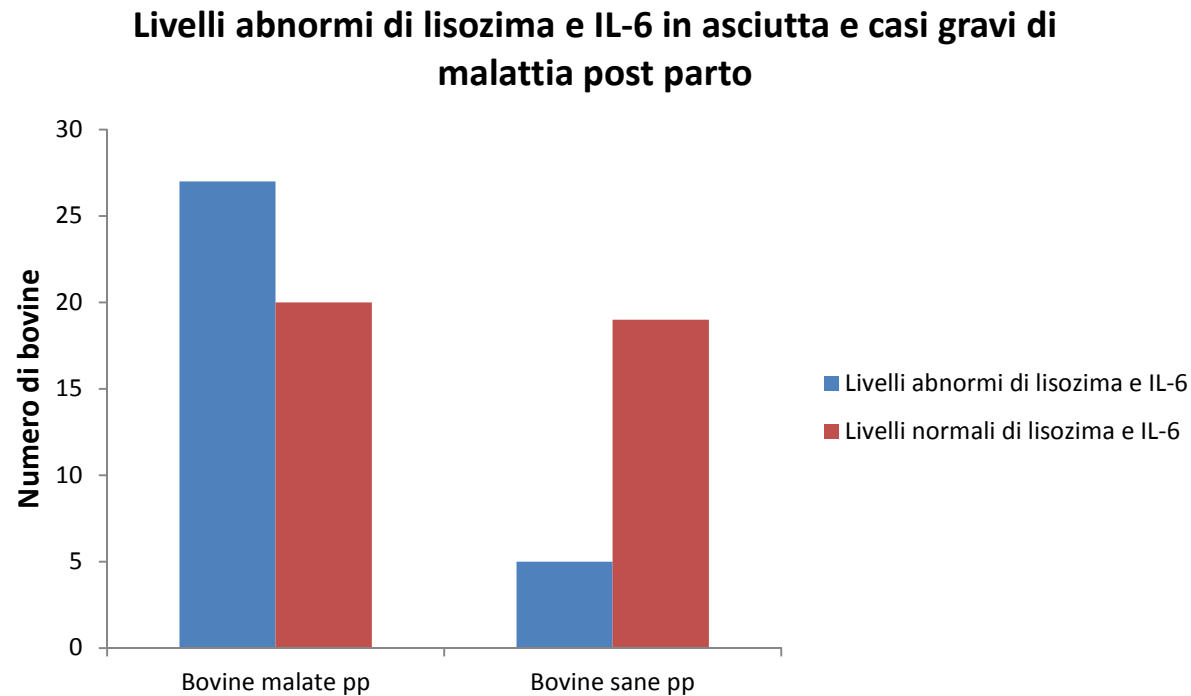
Livelli anormali di lisozima prima del parto e malattie del periparto (Amadori et al., 2014)



T1: giorni -23/-33. T2: -2/-6. $P < 0.01$ – Odds Ratio: 7,1



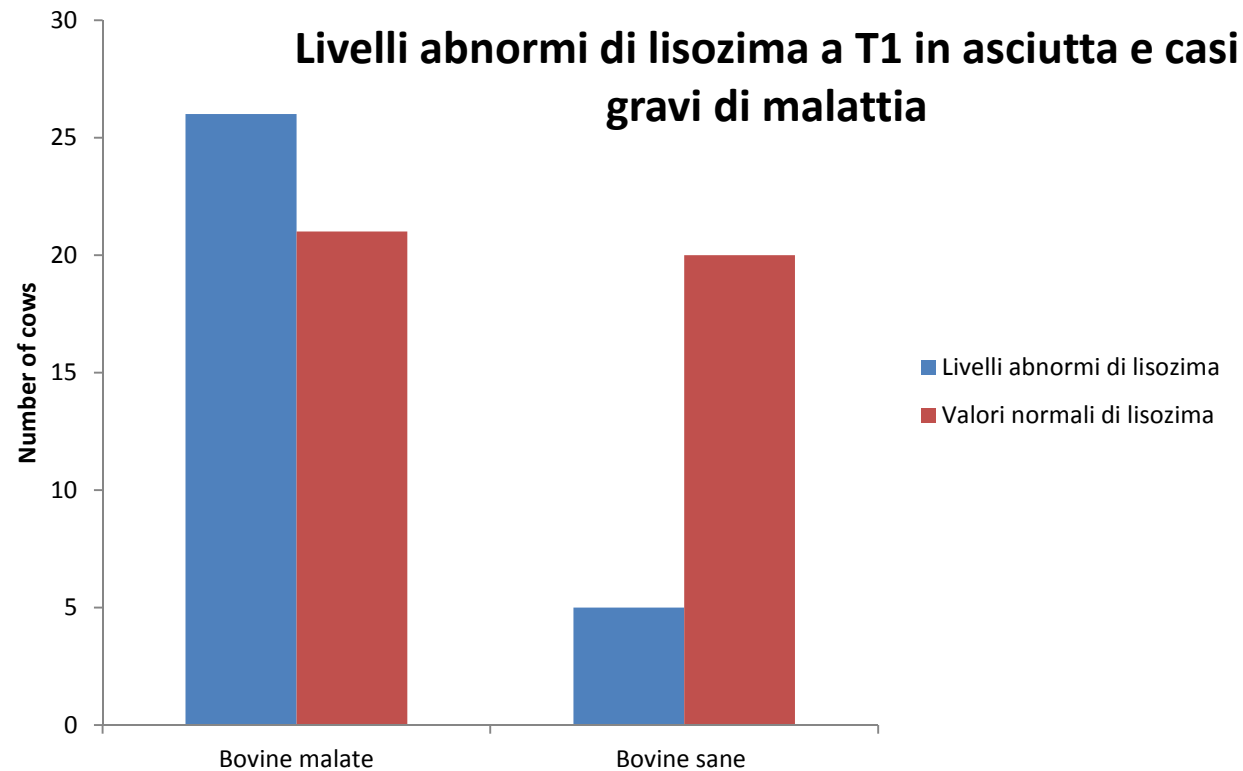
Livelli anormali di lisozima e IL-6 in asciutta a T1 + T2 e malattie post parto (Amadori et al., 2014)



P < 0.01 – Odds Ratio: 5,1



Valori anormali di lisozima in asciutta a T1 e malattie post parto (Amadori et al., 2014)



$P < 0.01$ – Odds Ratio: 4,9



Messaggi da riportare a casa

- Il **destino** della bovina da latte in transizione viene spesso deciso in **asciutta**.
- Su **tale periodo** devono concentrarsi le cure e i rilievi diagnostici, sia clinici che di laboratorio.
- I valori di **lisozima e IL-6 in asciutta** concorrono a identificare un rischio di malattia dopo il parto.
- Determinazioni del **profilo flogistico post parto** (LAI, LFI, PIRI) consentono il riconoscimento del problema in fase pre-clinica e l'effettuazione di **trattamenti tempestivi e più efficaci**.



Ringraziamenti



Giuseppe Bertoni, Erminio Trevisi

UNICATT, Istituto di Zootechnica, Piacenza

Alfonso Zecconi

*Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità
Pubblica (DIVET), UNIMI, Milano*

Nicola Lacetera

Università della Tuscia, Viterbo

**Ivonne Laura Archetti, Luigi Bertocchi, Dania
Bilato, Francesca Fusi**

IZSLER, Brescia

