

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE VETERINARIE  
Agripolis-35020 Legnaro (PD)

CORRELAZIONI TRA I LIVELLI EMATICI DEGLI ELEMENTI IN TRACCIA (ET) NELLA BOVINA DA LATTE AD ALTA PRODUZIONE (BLAP) E NEI VITELLI AFFETTI DA PATOLOGIE NEUROMUSCOLARI. (NOTA PRELIMINARE).

CORRELATION BETWEEN HAEMATIC LEVELS OF TRACE ELEMENTS (TE) IN HIGH PERFORMING DAIRY COWS AND CALVES WITH NEUROMUSCULAR DISEASES. A PRELIMINARY STUDY.

Bernardini D.<sup>1</sup>, Buoso M.C.<sup>2</sup>, Coppola L.M.<sup>1</sup>, Moschini G.<sup>2,3</sup>, Gerardi G.<sup>1</sup>, Ceccato D.<sup>2,3</sup>, De Poli M.<sup>2</sup>, Olabanji S.O.<sup>2,4</sup>, Uzunov N.<sup>2,5</sup>, Nicoletti L.<sup>6</sup>, Boldrin P.<sup>6</sup>

*1 Dipartimento Scienze Cliniche Veterinarie Università di Padova, 2 INFN, Laboratori Nazionali di Legnaro, 3 Dipartimento di Fisica, Università di Padova, 4 Obafemi Awolowo University, Ile-Ife Nigeria, 5 Department of Natural Sciences, Shumen University "K. Preslavsky", Bulgaria. 6 Medico Veterinario Libero Professionista*

Parole chiave: bovina, vitello, elementi in traccia, patologia neuromuscolare, intossicazione da bromo, siero, colostro.

Key words: dairy cow, calf, trace elements, neuromuscular disease, bromine intoxication, serum, colostrum.

## RIASSUNTO

Il frequente riscontro di patologie neuromuscolari in vitelli di aziende situate nella pianura Padano-Veneta, come riferito da colleghi Medico-Veterinari, ha indotto gli Autori ad approfondire le indagini allo scopo di individuare gli elementi eziopatogenetici in grado di sostenere tali patologie. Gli Autori, in assenza di alterazioni ematobiochimiche dei profili d'organo, hanno individuato un'azienda "problema" e dosato gli elementi in traccia (ET) nel siero di vitelli e nel siero e colostro delle madri. Contemporaneamente è stata individuata e controllata una azienda (azienda "controllo"), situata in un altro territorio, nella quale i dati anamnestici non riferivano la pregressa presenza di patologie neuromuscolari. I risultati hanno evidenziato, nei soggetti (madre/figlio) dell'azienda "problema", la presenza di concentrazioni altamente significative dell'elemento Bromo, tali da poter sostenere un probabile quadro di intossicazione. Gli elevati livelli di bromo, nel siero e colostro delle bovine e nel siero dei relativi vitelli, sono stati supportati dal reperimento di alti tenori, in parte nell'alimento solido ed in particolare nell'acqua di bevanda. Gli altri ET (Ca, Cu, Fe, Se), direttamente coinvolti a livello di placca neuromuscolare o di struttura miofibrillare e che hanno mostrato decrementi sierici nei vitelli, possono rappresentare fattori predisponenti nell'eziopatogenesi e nella comparsa del danno muscolare.

## SUMMARY

The frequent finding of neuromuscular affections in calves from farms placed in Padano-Veneta plain lead the authors to investigate the aetiopathogenesis of such diseases. Because of the lack of haematobiochemical profiles changes, the authors have located a "problem" farm and determined the trace elements (TE) both in serum of calves and in serum and colostrum of lactating cows. At the same time, another farm ("control farm"), presenting no affected calves, has been investigated. The results showed statistically significant higher concentrations of Bromine in the affected subjects. In our opinion, this could be considered the cause of intoxication. The high levels of Bromine were supported by the elevated concentrations, partly in the feedstuffs, but particularly in the drinking water. Other trace elements (Ca, Cu, Fe, Se), directly involved in the neuromuscular plaque or in myofibrils, showed a decrease in serum of the calves. The above reduction could be related to the aetiopathogenesis and the appearance of the muscular damage.

## INTRODUZIONE

Nell'ambito della collaborazione con i colleghi medico veterinari che operano sul territorio, abbiamo rilevato il frequente riscontro di patologie neuromuscolari a carattere sporadico in alcuni vitelli appartenenti ad aziende situate in un comprensorio della pianura padano-veneta, ( provincia RO-PD ) di razza frisona italiana di circa 30gg di età . Questo ci ha indotto, in assenza di alterazioni ematobiochimiche dei profili d'organo, ad indagare i livelli totali di alcuni elementi in traccia (ET) [Bromo (Br), Rame (Cu), Calcio (Ca), Fosforo (P), Potassio (K), Zinco (Zn), Cloro (Cl), Ferro (Fe), Zolfo (S) e Selenio (Se)], costituenti essenziali della placca neuromuscolare , nel sangue e nel colostro, nei vitelli e nelle relative madri (BLAP) ( rapporto madre/figlio). All'esame clinico dei soggetti sottoposti alla nostra attenzione è stato possibile reperire all' EOG: disarmonia dello sviluppo scheletrico; scadente stato di nutrizione con ipotonicità muscolare soprattutto a livello dei muscoli della coscia; stato del sensorio depresso con ritardata reazione agli stimoli superficiali; difficoltà deambulatoria e predilezione al decubito sternale o laterale; ipoelasticità cutanea con pelo opaco ed arruffato; parametri cardio-respiratori marcatamente aumentati in assenza di ipertemia con saltuario reperimento di extrasistolie; nelle regioni perineali materiale fecale a consistenza semiliquida; episodi di diarrea non emorragica, non fibrinosa e di colorito giallastro (Foto 1 e 2). Il quadro sintomatologico si è presentato con incidenza sporadica (5-10%) a decorso subacuto-cronico ad esito infausto (3-4% di mortalità). La parziale o totale remissione del quadro sintomatologico può essere ottenuta con somministrazione di terapia reidratante con integrazione di vitamine del complesso B ed oligoelementi. L'esame necroscopico eseguito su alcuni soggetti(3-4%), ha mostrato la presenza di cardiomegalia con ipertrofia ventricolare sinistra unitamente a modico risentimento alveolare di probabile formazione post-mortem. A livello muscolare è stata confermata una distrofia muscolare generalizzata.

La componente minerale dietetica nella BLAP, unitamente ad una pronta somministrazione di colostro ai vitelli ed ad altri fattori eziologici di natura genetica, ambientale e nutrizionale (management), acquisiscono importanza fondamentale per il normale trofismo neuro-muscolare. Abbiamo esaminato gli ET nella dieta alimentare e nell'acqua di bevanda (senza analisi del terreno poiché l'alimento non era prodotto in azienda) allo scopo di valutare tutte le possibili componenti eziologiche. Ulteriore scopo del nostro lavoro è stato quello di studiare le possibilità di utilizzo di alcune metodiche impiegate per il dosaggio degli ET nel siero e nel colostro nel bovino.

## MATERIALI E METODI

Sono state esaminate n° 70 bovine da latte (BLAP) di razza F.I. -pezzata nera-, pluripare e di età compresa tra 3 e 6 anni, appartenenti a n. 2 diverse aziende situate nel territorio della provincia RO-PD [n. 40 soggetti appartenenti all'azienda A e n. 30 soggetti appartenenti all'azienda B] con produzione latte media annua di 100 quintali. Nell'azienda A è stata utilizzata un'alimentazione con solo unifeed; nell'azienda B è stata somministrata una dieta alimentare composta di unifeed (30%) e fieno di graminacee (70%). In Tabella A viene riassunta la composizione percentuale della razione delle due aziende.

**Tab. A.** Composizione percentuale nella razione alimentare nelle due aziende

Componenti razione alimentare		Azienda A	Azienda B
Silomais		43	16
Soia FE		5	2
Mais farina		5	6
Medica disidratata			2
Fieno	medica		4
	graminacee		70
	loietto	46	
Integrazione oligominerale		1	

L'azienda B è stata da noi individuata in base a precedenti elementi anamnestici che riferivano la presenza di patologie neuromuscolari in vitelli di età compresa tra 40 gg e 70 gg. (azienda "problema"). L'azienda A, invece, per l'assenza di patologie neuromuscolari nei vitelli, è stata individuata come unità di controllo (azienda controllo). Da tutte le 70 bovine è stato prelevato un campione di sangue, dalla vena giugulare, in due momenti diversi: 15-20 gg prima del parto ed al momento del parto.

Ai vitelli, dopo il parto, è stato somministrato il colostro entro 4-6 ore ed è stato effettuato un prelievo ematico entro 18 ore.

I campioni di sangue, previa coagulazione per 2 ore a 38°C, sono stati centrifugati a 3000 giri per 20'. Il siero ottenuto è stato conservato in 2 aliquote: una di queste è stata utilizzata, entro 4-6 ore dal prelievo, per l'esecuzione di un profilo emato-biochimico (eseguito con metodiche Roche spa applicate su strumento Hitachi Automatic Analyzer modello 912 top) presso il Laboratorio di analisi cliniche del Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie -Università degli Studi di Padova-, la seconda è stata conservata a -20°C per l'analisi elementale degli ET effettuata presso il Laboratorio dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN) di Legnaro (PD).

E' stato esaminato anche il colostro, previo congelamento a -20°C, relativamente agli elementi in traccia. Gli ET sono stati valutati anche nell'alimento sia dell'azienda A che dell'azienda B previa riduzione in polvere per macinazione (effettuata presso il Laboratorio di analisi degli alimenti del Dipartimento di Scienze Zootecniche -Università degli Studi di Padova-) ed in un campione di acqua di bevanda (Laboratorio chimico del Dipartimento di Medicina Ambientale e Sanità Pubblica - Università degli Studi di Padova-). Per la preparazione dei campioni di alimento, siero e colostro sono stati seguiti due diversi protocolli, a seconda che si trattasse di materiali liquidi o solidi, in relazione ai relativi differenti metodi di analisi: Total Reflection X-Ray Fluorescence (TR-XRF) o Particle Induced X-ray Emission (PIXE).

#### *Campioni liquidi (TR-XRF) (Siero e Colostro)*

Per ogni campione di siero e di colostro, sono stati prelevati 200 µl. A questi sono stati aggiunti 10 µl di una soluzione standard di ittrio (15 ppm) utilizzata come tarante interno. Dalla soluzione ottenuta, dopo accurata miscelazione, sono stati prelevati 10 µl che sono stati depositati al centro di un riflettore di quarzo cristallino e fatti asciugare in vuoto.

#### *Campioni solidi (PIXE) (Alimento)*

Cinque aliquote di circa 180 mg, ciascuna, sono state prelevate da ogni campione di materiale polverizzato per ottenere una serie di pasticche (pellets). Le pasticche sono state formate utilizzando una pressa Perkin – Elmer da 15 tonnellate e un conio cilindrico di 13 mm di diametro. Per ottenere pastiglie con uno spessore ottimale di 2 mm e' stata applicata una pressione di 5 ton.. Per il controllo della qualità delle misure, utilizzando la stessa metodica, sono state preparate pastiglie di materiali standard certificati NIST-SRM 1515 Apple Leaves, NIST-SRM 1572 Citrus Leaves and NBS-SRM 1547 Peach Leaves con matrice organica analoga a quella dei campioni da analizzare. Sulle pellets e' stato successivamente depositato, mediante evaporazione, uno strato di 5 µg/cm<sup>2</sup> di carbonio per assicurare una buona conducibilità elettrica nella successiva fase di bombardamento.

Per evitare contaminazioni, tutti i campioni sono stati sigillati in contenitori di plastica ed inviati presso i Laboratori Nazionali di Legnaro dell'INFN per la successiva preparazione.

Tra le tecniche nucleari la TR-XRF e' la più idonea per l'analisi in traccia ed ultra-traccia in campioni liquidi (Van Grieken R.E., 1993). Per le misure e' stato utilizzato lo spettrometro TX2000 della ditta Ital Structures. Il tubo a raggi X di detto spettrometro e' stato fatto lavorare ad una tensione di 40kV ed una corrente di 30 mA. I raggi X di fluorescenza prodotti dal campione, sono stati rivelati mediante un rivelatore al Si(Li) di 20 mm<sup>2</sup> della ditta Röntec raffreddato alla temperatura dell'azoto liquido e con una finestra di berillio di 8µm di spessore. La risoluzione energetica del Si(Li) è stata di 137 eV per la riga K<sub>α</sub> del manganese. L'allineamento dei campioni è stato controllato da computer e il porta campioni rotante ha permesso l'analisi di 12 campioni in sequenza. Per il calcolo delle concentrazioni e' stato utilizzato il pacchetto software in dotazione dello strumento.

L'analisi elementale, utilizzando la tecnica PIXE, e' stata eseguita presso l'acceleratore van de Graaff AN2000 dei Laboratori Nazionali di Legnaro dell' INFN bombardando i campioni con un fascio di protoni di energia 1.8 MeV. L'apparato sperimentale è costituito da una camera di reazione dedicata e dotata di un cambia campioni automatico, controllato da computer, capace di contenere 30 campioni.

I raggi X sono stati rivelati utilizzando un rivelatore al Si(Li) di 80 mm<sup>2</sup> con una risoluzione (FWHM) di 160 eV a 5.9 keV. I segnali elettronici provenienti dal rivelatore sono stati processati con una catena elettronica standard ed un multicanale interfacciato a calcolatore per il salvataggio e l'analisi degli spettri energetici raccolti. Per evitare l'affollamento del rivelatore alle basse energie e' stato utilizzato un assorbitore di Mylar dello spessore di 150 mm forato al centro. Il foro consentiva l'acquisizione del 3% dei raggi X di bassa energia. Durante le misure, il conteggio del rivelatore e' stato mantenuto in limiti tali da non superare il 10% di tempo morto nella catena elettronica. Gli spettri energetici sono stati analizzati con il codice GUPIX per ricavare le concentrazioni dei singoli elementi.

#### *Campione di acqua di bevanda*

Onde poter esaminare tutte le componenti in grado di influenzare la presenza degli ET, è stata altresì eseguita un'analisi dell'acqua di bevanda, esaminando campioni d'acqua prelevati dall'abbeveratoio.

Ricerca chimico fisica:

**pH:** metodica n° 2080 IRSA-CNR (Istituto di Ricerca Sulle Acque – Consiglio Nazionale delle Ricerche); utilizzato il pH metro AMEL, 328 Ion Meter, Italia

**fosfati:** metodica n° 4090-A, IRSA-CNR (Istituto di Ricerca Sulle Acque – Consiglio Nazionale delle Ricerche); utilizzato lo spettrofotometro DR/2000 (HACH, Colorado, U.S.A.)

**ammoniaca:** metodica n° 4010-C, IRSA-CNR (Istituto di Ricerca Sulle Acque – Consiglio Nazionale delle Ricerche); utilizzato lo spettrofotometro DR/2000 (HACH, Colorado, U.S.A.)

**sostanza organica o ossidabilità di Kubel:** metodica riportata in "Metodi di analisi per le acque destinate al consumo umano", Istituto superiore di Sanità –rapporti Istisan 97/8 –

**anioni e cationi:** determinati mediante cromatografia a scambio ionico, utilizzando il cromatografo Dionex DX-120 e le colonne AS9-HC per gli anioni e CS12A per i cationi (Dionex Corporation, California, U.S.A.).

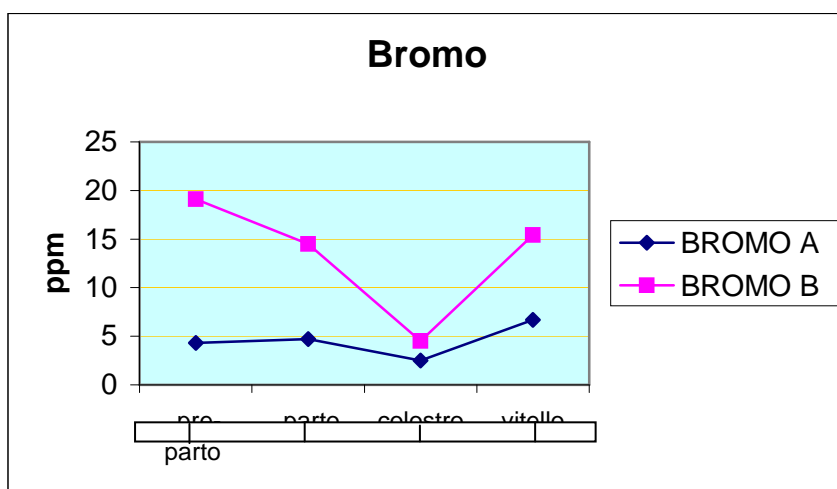
I valori degli elementi in traccia (ET) relativamente ai campioni di siero e colostro di tutte le n°70 bovine nei vari momenti (siero:15-20gg prima del parto e parto, colostro: entro 4-6h dopo il parto) e gli ET sierici dei rispettivi 70 vitelli( entro 18h dalla nascita), sono stati sottoposti ad analisi della Varianza secondo ANOVA (vedi Tabella n. B). Sono stati considerati significativi valori con  $P \leq 0.05$ .

## RISULTATI

I risultati dei singoli elementi in traccia (ET) sono stati riportati nelle Tabelle (B, C, D) e nei Grafici (1-10).

### **Bromo. (mdl 41ppb)**

Il comportamento di questo elemento (Grafico n.1) nei campioni di siero delle bovine e dei vitelli (madre-figlio), presenta nell'allevamento A (allevamento controllo) livelli da 2.8 a 8.2 ppm, mentre nell'allevamento B (allevamento "problema") livelli compresi tra 12.4 e 20.7 ppm. Relativamente ai sieri, nell'allevamento A, il Bromo si presenta in concentrazioni doppie rispetto all'allevamento B: nel preparto e nel parto con  $P \leq 0.001$ , nel vitello  $P \leq 0.01$ , nel colostro  $P \leq 0.05$ . Nei campioni di colostro, sia nell'allevamento A che B, il Bromo mostra livelli compresi tra 1.2 e 5.4 ppm con una media di 3.5 ppm. (Tab.B e D).

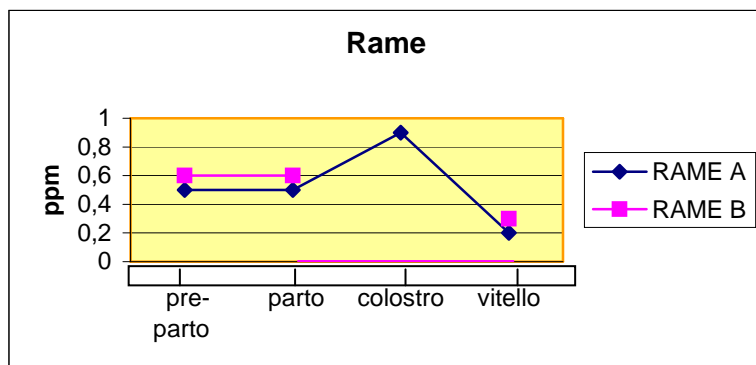


**Grafico n.1.** Comportamento del Bromo nel pre-parto, parto, colostro e vitello.  
A = Azienda controllo; B = Azienda "problema"

### **Rame. (mdl 25ppb)**

I valori del Rame nei sieri dell'azienda A sono compresi tra 0.1 e 0.9 ppm; nell'azienda B, invece, sono compresi tra 0.2 e 0.9 ppm. Per il colostro, i risultati sono relativi solo all'azienda A, in quanto nell'azienda B le concentrazioni sono risultate al di sotto del minimum detection limit (mdl) pari a 25 ppb.

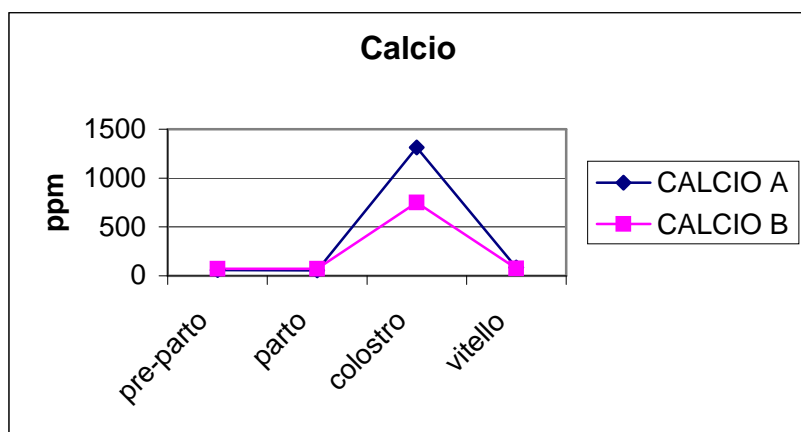
Nei vitelli il Cu si presenta con concentrazioni inferiori rispetto a quelle materne al momento del parto (Grafico n.2), fanno eccezione n. 7 vitelli dell'allevamento B ai quali non è stato somministrato latte materno ma latte ricostituito in quanto le madri erano affette da mastite. L'analisi statistica dei campioni sierici in entrambe le aziende nel pre-parto, parto e vitello non evidenzia differenze statisticamente significative ( $P > 0.05$ ) (Tab.D).



**Grafico n.2.** Comportamento del Rame nel pre-parto, parto, colostro e vitello.  
A = Azienda controllo; B = Azienda "problema".

### Calcio. Mdl(45ppb)

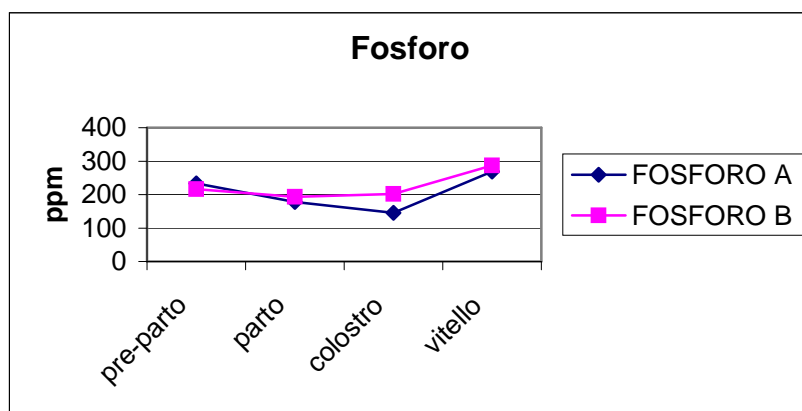
L'andamento del Calcio nei sieri dell'allevamento A e dell'allevamento B è pressoché sovrapponibile (Grafico n.3), con valori compresi tra 40.6 e 97.7 ppm; una differenza significativa si evidenzia, invece, nel colostro, nel quale i valori sono compresi tra 407 e 807 ppm nell'allevamento A e tra 872 e 1771 ppm nell'allevamento B. Si discostano da tale risultato i livelli riscontrati nei soggetti affetti da mastite (fino a 2251 ppm) L'analisi statistica risulta significativa al parto ( $P \leq 0.05$ ) e nel colostro ( $P \leq 0.01$ ). Relativamente al pre-parto e al vitello non è significativa ( $P > 0.05$ ) (Tab.D).



**Grafico n.3.** Comportamento del Calcio nel pre-parto, parto, colostro e vitello.  
A = Azienda controllo; B = Azienda "problema"

### Fosforo. (mdl 2ppm)

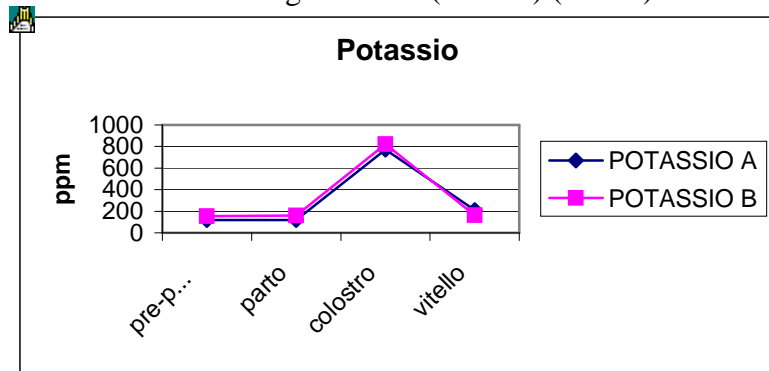
I valori del Fosforo nei vitelli si presentano molto simili o maggiori a quelli materni (Grafico n.4) (nell'allevamento A i valori sierici della madre al pre-parto sono in media 233.7 ppm e nel vitello 268.7, nell'allevamento B sono, nella madre 216.7 e nel vitello 287.5 ppm -Tabella B-). L'elaborazione statistica non evidenzia differenze significative relativamente ai sieri ( $P > 0.05$ ). Particolarmente significativo è l'andamento del Fosforo nel colostro ( $P \leq 0.05$ ) (Tabella D) Esso, infatti, presenta nell'allevamento B valori medi pari alla metà di quelli riferibili all'allevamento A.



**Grafico n.4.** Comportamento del Fosforo nel pre-parto, parto, colostro e vitello.  
A = Azienda controllo; B = Azienda "problema".

### Potassio. (mdl 0.5ppm)

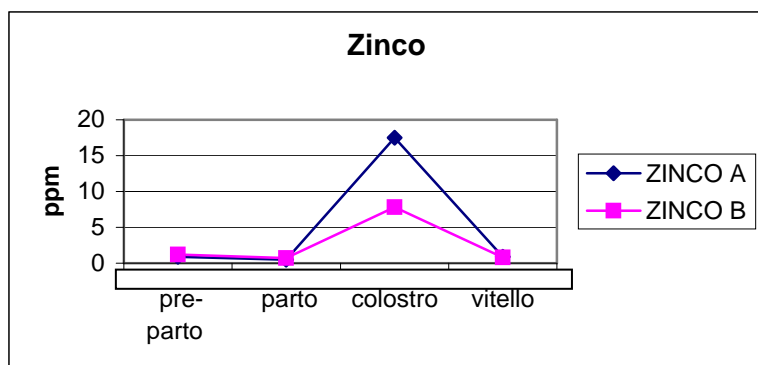
L'andamento del Potassio è sovrapponibile nell'allevamento A e nell'allevamento B (Grafico n.5). I valori sierici nell'allevamento A sono compresi tra 59.9 e 190 ppm, nell'allevamento B tra 139 e 185 ppm; nel colostro i valori sono compresi tra 223 e 494 ppm nell'azienda A, e tra 312 e 1155 nell'allevamento B. Fanno eccezione i valori rilevati nelle bovine affette da mastite (fino a 1570 ppm). L'analisi statistica si presenta con  $P \leq 0.05$  al parto. Invece nel pre-parto, nel vitello e nel colostro non risulta significativa ( $P > 0.05$ ) (Tab.D).



**Grafico n.5.** Comportamento del Potassio nel pre-parto, parto, colostro e vitello.  
A = Azienda controllo; B = Azienda "problema".

### Zinco. mdl(30ppb)

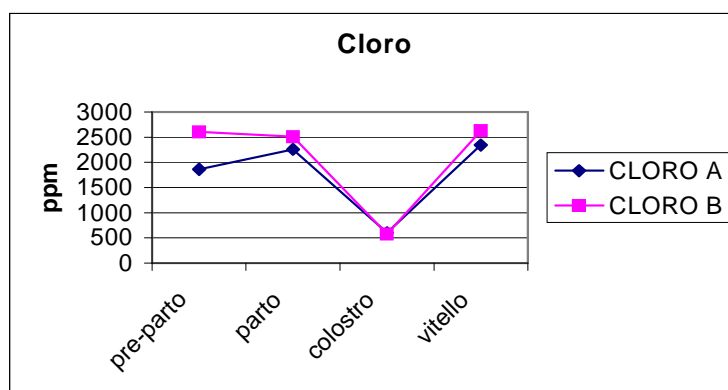
I valori sierici nell'allevamento A sono compresi tra 0.2 e 1.2 ppm, nell'allevamento B tra 0.6 e 1.4 ppm; il colostro ha un andamento diverso nelle due aziende ( $P \leq 0.01$ ) (Grafico n.6 e Tab.D): compreso tra 8.7 e 23.4 ppm nell'azienda A e tra 3.4 e 13.5 ppm nell'azienda B. Fanno eccezione i colostri delle bovine affette da mastite (fino a 29.5 ppm).



**Grafico n.6.** Comportamento dello Zinco nel pre-parto, parto, colostro e vitello.  
A = Azienda controllo; B = Azienda "problema".

### Cloro. mdl(1ppm)

Nelle due aziende, il Cloro ha un andamento sovrapponibile (Grafico n.7), con valori riscontrati nei sieri dell'allevamento A compresi tra 1129 e 3077 ppm e nell'allevamento B tra 1972 e 2789 ppm. Nel colostro i valori sono compresi tra 209 e 944 nell'allevamento A e tra 310 e 1019 nell'allevamento B. L'analisi statistica non presenta significatività ( $P > 0.05$ ) sia relativamente ai sieri che al colostro (Tab.D).



**Grafico n.7.** Comportamento del Cloro nel pre-parto, parto, colostro e vitello.

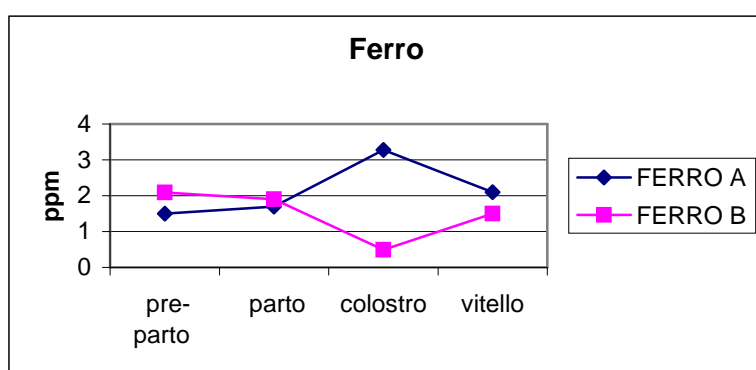
A = Azienda controllo; B = Azienda “problema”.

### Ferro. mdl (35 ppb)

I valori relativi ai sieri nell'allevamento A sono compresi tra 0.7 e 3.5 ppm e nell'allevamento B tra 0.5 e 3.4 ppm. Nel colostro i valori si presentano diversi nelle due aziende (Grafico n.8): compresi tra 1.6 e 4.5 ppm nell'allevamento A, nell'allevamento B tra 0.4 e 0.5 ppm. Un'anomalia si può evidenziare in una bovina dell'allevamento controllo con valore estremamente alto nel colostro (7.9 ppm), presumibilmente dovuto ad un errore di dosaggio. L'elaborazione statistica non evidenzia significative variazioni ( $P > 0.05$ ) riguardo a questo elemento, tranne nel pre-parto ( $P \leq 0.05$ ) (Tab.D).

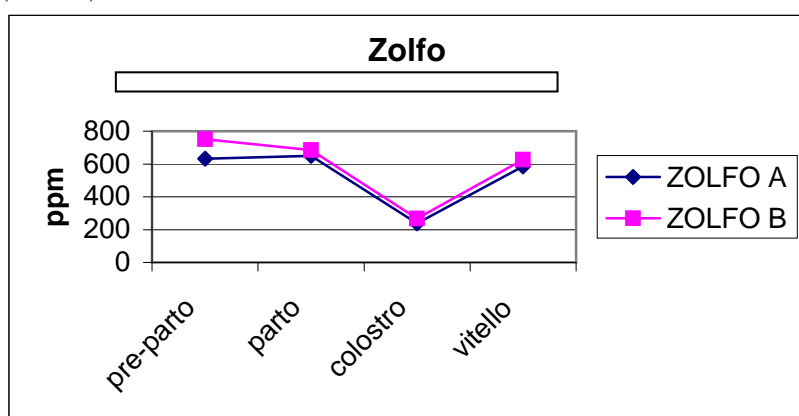
**Grafico n.8.** Comportamento del Ferro nel pre-parto, parto, colostro e vitello.

A = Azienda controllo; B = Azienda “problema”.



### Zolfo. mdl (1 ppm)

I valori dei sieri nell'allevamento A sono compresi tra 435 e 737 ppm, nell'allevamento B tra 382 e 805 ppm,; il colostro dell'allevamento A ha concentrazioni comprese tra 138 e 298 ppm, in quello dell'allevamento B tra 192 e 305 ppm dimostrando un comportamento sovrapponibile nelle due aziende (Grafico n.9). L'elaborazione statistica non rileva comportamenti significativi ( $P > 0.05$ ) (Tab.D).



**Grafico n.9.** Comportamento dello Zolfo nel pre-parto, parto, colostro e vitello.

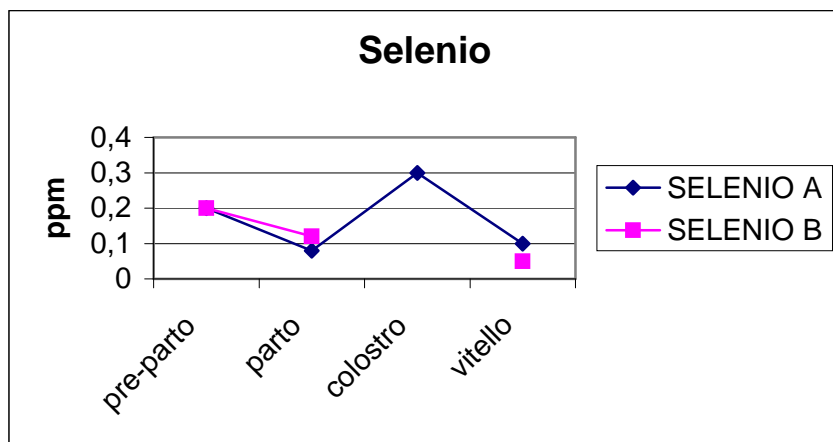
A = Azienda controllo; B = Azienda “problema”.

### Selenio.

Il comportamento del Selenio nei sieri delle due aziende è pressoché sovrapponibile (Grafico n.10), con valori compresi tra 0.02 e 0.2 ppm. È da sottolineare che in alcuni campioni dell'allevamento B il Selenio è presente in quantità estremamente basse, tanto che il valore risulta al di sotto della



soglia di sensibilità dello strumento [minimum detection limit (mdl) = 20 ppb]. L'indagine statistica relativa ai sieri non rileva comportamenti significativi ( $P > 0.05$ ); nel colostro, invece, non è stato possibile effettuare il confronto statistico tra i due allevamenti poiché mancavano i dati relativi all'allevamento "problema" (B) (valori  $< \text{mdl}$ ) (Tab.D)



**Grafico n.10.** Comportamento del Selenio nel pre-parto, parto, colostro e vitello.  
A = Azienda controllo; B = Azienda "problema".

**Tab.B.** Valori medi ottenuti dall'analisi elementare del siero al pre-parto, parto e vitello; del colostro e dell'alimento. I valori sono espressi in ppm.

tipo di campione	BROMO		RAME		CALCIO		FOSFORO	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Siero pre-parto	4,3	19,1	0,5	0,6	57,7	72,5	233,7	216,7
Siero parto	4,7	14,5	0,5	0,6	56,1	72,6	178,1	193,3
Colostro	2,5	4,5	0,9	-	1314,8	751	145	202,3
Siero vitello	6,7	15,4	0,2	0,3	83,9	75,4	268,7	287,5
Alimento	26.6	42.3	19.2	310.8	5775.8	8866.1	2816.6	2004.6

tipo di campione	POTASSIO		ZINCO		CLORO		FERRO	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Siero pre-parto	119,03	153	0,9	1,2	1864,3	2607,3	1,5	2,09
Siero parto	119,02	160,3	0,5	0,7	2260	2509	1,7	1,9
Colostro	772,8	821,7	17,5	7,8	602,5	574,7	3,28	0,49
Siero vitello	210,5	163	0,9	0,8	2342,7	2626,8	2,1	1,5
Alimento	21630.4	20877.3	923.6	390.4	9349.4	5936.4	3231.8	708.7

tipo di campione	ZOLFO		SELENIO	
	A	B	A	B
Siero pre-parto	632,5	750,3	0,2	0,2
Siero parto	650	684	0,08	0,12
Colostro	237,5	267,3	0,3	-
Siero vitello	585,3	626,3	0,1	0,05
Alimento	1470.2	1188.4	-	-

Relativamente all'acqua di bevanda, le analisi effettuate nell'allevamento "problema" (B) evidenziano un aumento di Bromo, Potassio e Cloruri ed una diminuzione di Calcio e Magnesio rispetto all'allevamento controllo (vedi Tabella n. ...). Riguardo al Br si presume che il suo aumento nel siero e nell'alimento (fieno di graminacee) possa essere correlato ai valori alti riscontrati nell'acqua (utilizzata per l'irrigazione). Invece, al tasso elevato di K e Cl rilevato

nell'acqua non corrispondono valori alti nel siero. Ciò fa presupporre che l'eccesso di K e Cl a livello intestinale venga eliminato.

**Tab.C.** Valori relativi all'analisi dell'acqua di bevanda.

Parametro	Espressione dei risultati	Valore Allevamento A (controllo)	Valore Allevamento B (problema)
pH		7.37	7.72
Fosfati	mg/l PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.32	3.4
Ammoniaca	mg/l NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.09	0.45
Sostanza organica	mg/l O <sub>2</sub>	0.4	1.68
Fluoro	mg/l F <sup>-</sup>	0.12	0.35
Cloruri	mg/l Cl <sup>-</sup>	19.86	158.45
Nitriti	mg/l NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<0.04	<0.04
Bromo	mg/l Br <sup>-</sup>	<0.16	0.61
Nitrati	mg/l NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	21.55	0.27
Solfati	mg/l SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	16.11	12.30
Iodio	mg/l I <sup>-</sup>	<0.24	<0.24
Litio	mg/l Li <sup>+</sup>	<0.002	<0.002
Sodio	mg/l Na <sup>+</sup>	23.89	120.63
Potassio	mg/l K <sup>+</sup>	7.9	8.14
Magnesio	mg/l Mg <sup>2+</sup>	27.15	13.31
Calcio	mg/l Ca <sup>2+</sup>	62.78	29.50

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'analisi dei risultati da noi ottenuti ci consente di poter effettuare alcune valutazioni relative al comportamento dei vari elementi in traccia (ET) nel sangue e nel colostro, nonché le loro correlazioni in vitelli affetti da un danno neuromuscolare (Tabella D).

**Tab. D.** Comportamento e correlazioni degli ET nel siero e nel colostro delle bovine da latte ad elevata produzione (BLAP) e nel siero dei vitelli nell'Azienda A (azienda controllo) e nell'azienda B (azienda "problema").

Elemento	Pre-parto (15-20gg) siero			Parto siero			Colostro			Vitello siero		
	Az. A	Az.B	P	Az. A	Az. B	P	Az. A	Az. B	P	Az. A	Az. B	P
Bromo	4.3	↑	***	4.7	↑	***	2.5	↑	*	6.7	↑	**
Rame	0.5	↑	ns	0.5	↑	ns	0.9	↓	-	0.2	↑	ns
Calcio	57.7	↑	ns	56.1	↑	*	1315	↓	**	83.9	↓	*
Fosforo	233.7	↓	ns	178.1	↑	ns	145	↑	ns	268.7	↑	ns
Potassio	119	↑	ns	119	↑	ns	772.8	↑	ns	210.5	↓	ns
Zinco	0.9	↑	ns	0.5	↑	ns	17.5	↓	**	0.9	↓	ns
Cloro	1864	↑	ns	2260	↑	ns	602.5	↓	ns	2343	↑	ns
Ferro	1.5	↑	*	1.7	↑	ns	3.28	↓	**	2.1	↓	ns
Zolfo	632.5	↑	ns	650	↑	ns	237.5	↑	ns	585.3	↑	ns
Selenio	0.2	↔	ns	0.08	↑	ns	0.3	↓	-	0.1	↓	ns

Az. A = Azienda di controllo; Az. B = Azienda "problema"; ↔ = valori uguali all'azienda di controllo; ↑ = valori superiori all'azienda di controllo; ↓ = valori inferiori all'azienda di controllo; ns = differenze non significative; \* = significativo per P ≤ 0.05; \*\* = significativo per P ≤ 0.01; \*\*\* = significativo per P ≤ 0.001. I valori sono espressi in ppm.

Il costante e marcatamente significativo ( $P \leq 0.001$ ) rilevato a carico dell'elemento Bromo nei soggetti con patologie neuromuscolari (Azienda "problema"-B) può essere ritenuto un parametro eziologico in grado di sostenere il grave quadro clinico, se confrontato con i livelli presenti nel siero dei soggetti appartenenti all'azienda senza patologie in atto (Azienda controllo-A-).

A nostro avviso ed in assenza di elementi bibliografici a riguardo, riteniamo che, probabilmente, l'eccessiva concentrazione sierica del Bromo possa interferire negativamente a livello di placca neuromuscolare, intervenendo forse in maniera competitiva od inibitoria nei riguardi di altri elementi presenti a tale livello od in altre strutture con esso interagenti. Tali significativi incrementi possono essere direttamente rapportati al reperimento nell'acqua di bevanda ed in parte nell'alimento (vedi tab. B ed C) di elevate concentrazioni tali da sostenere un probabile quadro di intossicazione.

I bassi tenori di Rame, riscontrati nei sieri di vitelli con problemi neuromuscolari, concordano con quanto riportato da Bertoni G. et al., (1976) e si possono, a nostro avviso, rendere responsabili dei danni a carico delle miofibrille muscolari poiché questo elemento si investe di un'attività protettiva nei riguardi della perossidazione degli eritrociti, esplica un'azione favorente la mobilitazione delle riserve di Ferro e presenta una funzione positiva nella composizione delle scleroproteine e della sintesi dei fosfolipidi. Inoltre il contemporaneo eccesso di Zolfo e/o Ferro, riscontrato nei vitelli dell'azienda B, può favorire un decremento dei livelli di Rame come rilevato da Cappa V. et al. (1978), Suttle N.F. (1980), Suttle N.F. et al. (1983), Bremner I. et al. (1987), Phillippo et al. (1987).

Lo Zolfo ha infatti mostrato un innalzamento nei valori assoluti nel pre-parto, parto e nel colostro delle bovine e nei sieri dei vitelli pur non investendosi di differenze significative rispetto all'azienda di controllo.

Parimenti l'elemento Fe in relazione all'azienda A ha evidenziato significativi incrementi sierici ( $P \leq 0.05$ ) nel pre-parto con più elevati e significativi innalzamenti nel colostro ( $P \leq 0.01$ ) tanto da poter sostenere un secondario decremento dello Zolfo.

L'elemento Calcio ha mostrato un omogeneo comportamento sierico al momento del pre-parto e parto, rispetto all'azienda A, investendosi di significatività ( $P \leq 0.05$ ) solo al momento del parto. In sintonia con quanto riportato da Bertoni G. et al. (1998) le concentrazioni di tale elemento nel colostro delle bovine e nel siero dei vitelli dell'azienda B hanno evidenziato decrementi significativi in grado di poter determinare situazioni carenziali nella formazione di tessuto osseo e nella trasmissione degli impulsi neuromuscolari, motivando il quadro clinico evidenziatosi nei vitelli.

Relativamente all'elemento Fosforo possono esser rilevati lievi incrementi nel siero e nel colostro delle bovine e nel siero dei vitelli dell'azienda B senza mai peraltro investirsi di alcuna significatività.

L'elemento Potassio presentando un decremento, seppur non significativo, nel siero dei vitelli dell'azienda B, si diversifica da quanto riportato per il Fosforo. Tale rilievo in presenza delle funzioni enzimatiche del Potassio nella regolazione degli stimoli neuromuscolari può rappresentare un ulteriore elemento in grado di contribuire all'eziopatogenesi dei quadri patologici riscontrati nei vitelli.

Lo Zinco nel siero delle bovine dell'azienda B ha mostrato un andamento disomogeneo nel pre-parto e parto, con valori superiori, ma non significativi, rispetto all'azienda controllo; mentre ha mostrato decrementi significativi nel colostro delle bovine ( $P \leq 0.01$ ) e non significativi nel siero dei vitelli. Tale situazione carenziale può rendersi causa (Bonomi A. et al., 2000) di una riduzione di appetito con ridotto accrescimento.

Il Cloro ed il Selenio mostrano un analogo comportamento caratterizzato nel siero delle bovine dell'azienda B da omogenei incrementi nel pre-parto e parto senza peraltro rendersi mai significativi; mentre nel colostro delle bovine e nel siero dei vitelli si evidenziano lievi decrementi non significativi.

A completamento delle considerazioni scaturite dai risultati ottenuti ci è sembrato opportuno correlare i tenori sierici degli elementi in traccia (ET) nelle bovine nel pre-parto e parto con quelli presenti nel colostro e nel siero dei vitelli.

Al momento del parto, nell'azienda "problema"(B) si ha un incremento, seppur non significativo, di tutti gli ET ad eccezione del Bromo che risulta altamente significativo ( $P \leq 0.001$ ) rispetto ai tenori presenti nell'azienda controllo (A). Tali incrementi si ripercuotono nel colostro solamente per alcuni elementi (Br, P, K, Zn, Cl, S), mentre per gli altri (Cu, Ca, Fe, Se) si osserva un opposto andamento. Tale rilievo ci induce ad ipotizzare che il paritetico incremento (siero-colostro) sia imputabile ad un trasferimento passivo di alcuni ET, mentre i decrementi colostrali rispetto ai sieri di altri elementi possono essere riferibili ad un difficoltato trasferimento di origine neuro-ormonale o ad un ostacolato passaggio attraverso la barriera emato-mammaria.

Tale correlazione conferma i costanti ed altamente significativi tenori di Bromo nei soggetti affetti da patologie neuromuscolari (Azienda B) rispetto ai soggetti di controllo. Questi elevati livelli confermano la presenza di un quadro di tossicosi primaria da Bromo assunto in quantità rilevante mediante l'acqua di bevanda ed in misura minore mediante l'alimento solido. La marcata ed altamente significativa concentrazione di Bromo ( $P \leq 0.01$ ) reperita nel siero dei vitelli riteniamo possa essere considerata come elemento eziologico in grado di sostenere i quadri clinici neuromuscolari a decorso subacuto e rendersi causa dell'esito infausto rilevato in alcuni vitelli (mortalità 3-4%).

I comportamenti degli elementi in traccia (ET) e le loro correlazioni siero-colostro bovine/siero vitelli, dopo questi nostri preliminari riscontri, dovranno essere ulteriormente verificati ed indagati in particolare nei casi in cui venga reperito nei vitelli un quadro sintomatologico caratterizzato da patologie neuromuscolari.

Si ringrazia il Prof. Massimo Riolfatti e la Dr.ssa Alessandra Corazzina del Dipartimento di Medicina Ambientale e Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Padova per l'esecuzione delle analisi chimico-fisico dell'acqua di bevanda.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Bertoni G., Galimberti A. (1976): Ricerche sull'attività istaminolitica della ceruloplasmina. Riv. Zoot. Vet., 5 (5), 383-389.
- 2) Bertoni G., Calamari G., Trevisi E. (1998): Nuovi criteri per l'individuazione dei valori di riferimento di taluni parametri ematici in bovine da latte. Atti I Conv. Naz. Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria. Salsomaggiore Terme (Pr).
- 3) Bonomi A., Bonomi B. M., Quarantelli A. (2000): Contenuto in potassio della razione e carenza di zinco nelle bovine da latte. Obiettivi e documenti veterinari; 2: 37-47.
- 4) Bremner I., Humphries W.R., Phillippo M., Walzer M.J. & Morrice P.C. (1987): Iron-induced copper deficiency in calves: dose-response relationship and interactions with molybdenum and sulphur. Animal production; 45, 403-414.
- 5) Cappa V., Bertoni G., Maianti M. G. (1978): Ricerche sull'antagonismo fra rame, molibdeno e solfati negli ovini. Atti S.I.S. Vet.; 32, 402-403.
- 6) Phillippo M., Humphries W.R., Garthwaite P.H. (1987): The effect of dietary molybdenum and iron on copper status and growth in cattle. Journal of Agricultural Science, Cambridge; 109, 321-336.
- 7) Suttle N. F. (1980): The role of thiomolybdates in the nutritional interaction of copper, molybdenum and sulfur: fact or fantasy? Annales New York Academy Sciences; 335,159-207.
- 8) Suttle N. F., Field A.C. (1983): Effect of dietary supplements of thiomolybdates on copper and molybdenum metabolism in sheep. J. Comp. Path.:93, 379-389.
- 9) Van Grieken R.E. , Markowicz A. (1993): Handbook of X-Ray Spectrometry. Methods and Techniques (editrice M. Dekker.





