

EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE PARENTERALE DI SELENIO E VITAMINA E SU ALCUNI PARAMETRI DELL'IMMUNITÀ ASPECIFICA E STATO OSSIDATIVO IN BOVINE DI RAZZA CHIANINA

Moscatti L. (1), Beghelli D. (2), Valbonesi A. (2), Sensi M. (1), Mangili P.M. (1), Marchi S. (1), Battistacci L. (1)

(1) *Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche – Via Salvemini, 1 - 06100 Perugia, Italia*

(2) *Dipartimento di Scienze Veterinarie - Università di Camerino - Via Circonvallazione, 93/95 - 62024 Matelica, Macerata, Italia*

RIASSUNTO - Molti ricercatori hanno dimostrato la presenza di correlazioni tra carenze e/o squilibri alimentari e il rischio di contrarre un'infezione/malattia, legata alla minore capacità, da parte dell'animale, di modulare le risposte immunitarie. Esiste una bibliografia abbastanza ampia sugli effetti immunomodulatori dell'integrazione di vitamina E e selenio in animali da latte (bovini ed ovini). Scopo del presente lavoro è studiare gli effetti dell'integrazione di selenio e vitamina E su alcuni parametri di immunità aspecifica e stato ossidativo in bovine da carne di razza Chianina all'8° mese di gravidanza.

PAROLE CHIAVE: Chianina, Immunità aspecifica, eGSHPX, PAO, ROMs

INTRODUZIONE

I bovini di razza Chianina, allevati per la produzione di carne, vengono selezionati sulla base della velocità di accrescimento, precocità e resa alla macellazione. Proprio in virtù del rapido accrescimento, però, se l'alimentazione non è adeguatamente bilanciata possono insorgere problemi carenziali. Negli ultimi anni diversi ricercatori sono riusciti a dimostrare la presenza di correlazioni tra carenze e/o squilibri alimentari di alcuni microelementi e/o vitamine e la maggior facilità di contrarre un'infezione/malattia, legata alla minore capacità, da parte dell'animale, di modulare le risposte immunitarie (Sordillo *et al.*, 1997). Esiste, ad esempio, una bibliografia abbastanza ampia sugli effetti immunomodulatori dell'integrazione di vitamina E (vit E) e selenio (Se) in animali da latte (bovini ed ovini) (Pollock *et al.*, 1994; Malbe *et al.*, 1995; Politis *et al.*, 1996; Beghelli *et al.*, 1995; Finch *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1995). Negli animali da carne, oltre all'ormai ben noto effetto dell'integrazione sulla miodistrofia, sarebbe stata notata in agnelli nati da madri che avevano ricevuto l'integrazione durante la gestazione, una maggiore capacità di resistenza ad infezioni da E. Coli, Pasteurella, Chlamydia ed diverse forme gastroenteriche, con conseguente ridotta natimortalità e mortalità nel primo mese di vita (Stephens *et al.*, 1979). In questo studio si è voluto valutare, in bovini da carne di razza Chianina, eventuali effetti dell'integrazione di vit. E e Se su alcuni parametri di immunità naturale (titolazione semiquantitativa del complemento, titolazione del lisozima sierico, attività battericida del siero), sull'attività dell'enzima glutatione perossidasi eritrocitaria (eGSHPX), sulla presenza di radicali liberi dell'ossigeno (ROMs) e loro derivati nel siero, nonché sulla misurazione del potere antiossidante sierico (PAO).

MATERIALI E METODI

Sono stati presi in esame tre allevamenti di bovini da carne di razza Chianina, ubicati nella Media Valle del Tevere e perciò considerati uniformi per quanto riguarda l'aspetto ambientale e orogeografico. Tutti gli allevamenti sono di tipo semibrado, con alimentazione a base di foraggi prodotti in azienda. I primi due allevamenti, a causa della segnalazione nel recente passato, di quadri clinici di miodistrofia fra i vitelli neonati, sono stati rispettivamente eseguiti

due tipi di integrazione con vitamina E e selenio. Nel primo venivano lasciati a disposizione degli animali “rulli” di sale Maxi Red Lick- Agrolabo (cloruro di sodio e ossido di magnesio integrato con ossido ferrico, ossido di zinco, ossido manganoso, solfato rameico pentaidrato, ioduro di potassio, carbonato basico di cobalto monoidrato e selenito di sodio); nel secondo allevamento, invece, gli animali hanno ricevuto una duplice somministrazione, per via parenterale, di Selevit Fatro (sodio selenito, vitamina E, vitamina B12, vitamina B1, sorbitolo) nella quantità di 10 cc a 40 e 30 giorni prima della data presunta del parto. Nei primi due allevamenti sono stati rispettivamente sottoposti a prelievo 5 animali all'8° mese di gestazione (gruppo A e gruppo B); mentre nel terzo allevamento, nel quale non si erano verificate problematiche riconducibili a miodistrofia, i prelievi hanno riguardato 10 soggetti nello stesso periodo di gestazione (gruppo C). Tale allevamento, non essendo sottoposto a trattamento, è stato considerato come controllo. In tutti i soggetti al mattino, prima della somministrazione degli alimenti, è stato effettuato un prelievo di sangue con (litioeparina) e senza anticoagulante. Il siero, aliquotato a - 80°C fino al momento dell'uso, è stato utilizzato per la determinazione dei parametri di immunità aspecifica, ROMs e PAO; il sangue in toto con anticoagulante, invece, conservato a - 20°C, è stato utilizzato per la determinazione dell'attività di eGSHPX e determinazione della concentrazione emoglobinica. La titolazione del Lisozima sierico è stata eseguita secondo la metodica di Osseman *et al.* (1996) e la sua concentrazione espressa in µg/ml. Il test di determinazione in micrometodo della Battericidia sierica, espressa in %, è stato eseguito secondo la metodica di Amadori *et al.* (1997) e consiste nel valutare la capacità del siero di inibire la crescita batterica grazie alla presenza sia di fattori del complemento, che di modeste concentrazioni di anticorpi naturali. I valori della titolazione semiquantitativa del complemento emolitico, eseguita secondo le metodiche di Barta *et al.* (1993), vengono espressi come CH50 e sono indice tanto della competenza immunitaria dell'ospite nei confronti dei patogeni ambientali o di patologie a sfondo flogistico subacuto/cronico, che dello stato di benessere ambientale. La determinazione dei radicali liberi di ossigeno e loro derivati (ROMs), nonché del potere antiossidante (PAO) nel siero è stata effettuata attraverso l'utilizzo di kits commerciali della Diacron (Grosseto, Italia) e spettrofotometro SLT Spectra per micropiastre (Brambilla *et al.* 2002). La misurazione dei ROMs si basa sulla rilevazione spettrofotometrica dell'aumento di intensità di colorazione che si sviluppa quando, ad un campione di siero viene aggiunta una soluzione cromogena: essa è direttamente proporzionale alla concentrazione dei derivati dei ROMs presenti nel campione. La determinazione del Potere Anti Ossidante (PAO) misura l'ossidazione del siero da parte di una soluzione a titolo noto di acido ipocloroso. L'eccesso di ossidante aggiunto e non neutralizzato dal poter antiossidante del siero, viene rilevato spettrofotometricamente mediante reazione colorimetrica. La valutazione dell'attività di glutazione perossidasi eritrocitaria (eGSHPX) è stata effettuata tramite l'impiego di metodiche e reagenti della Randox (Randox Laboratories, Crumlin, U.K.) ed analizzatore automatico Hitachi 704. L'attività di tale enzima è direttamente correlata ai valori ematici e tissutali di selenio e rappresenta, pertanto, un ottimo indice del corretto apporto dietetico di questo microelemento e/o della risposta animale alla somministrazione del microelemento stesso condotta per via orale o parenterale. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) utilizzando il programma statistico SPSS 12.0 (2003). Per i confronti multipli è stato utilizzato il test di Bonferroni, quando le varianze tra i gruppi erano omogenee, o il test di Tamhane, quando questo presupposto non era soddisfatto.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella tabella n.1 vengono riportati i valori medi e relative deviazioni standard (ds) dei parametri considerati nei diversi gruppi di animali. Innanzitutto, come si può vedere nella tabella, in tutti e tre gli allevamenti sono stati registrati valori di attività dell'enzima eGSHPX superiori al range considerato adeguato per la specie (Bengoumi *et al.* 1998) e questo spiega la mancanza di variazioni significative tra i diversi allevamenti. Se da un lato, questo significa

che, lì dove era stata precedentemente segnalata una carenza di selenio, il trattamento (sia per os che i.m.) è risultato efficace nel riportare i valori di questo enzima nei range considerati adeguati, dall'altro, forse proprio questi ultimi devono venire presi come intervalli di riferimento per i bovini di razza Chianina. Come già segnalato, infatti, ci possono essere variazioni dei range di riferimento delle attività enzimatiche, legate alle razze (Matthes *et al.* 2002), volte a valutare lo stato ossidativo. Relativamente ai valori di immunità naturale i range di riferimento per la specie bovina vengono rispettati per il complemento e la battericidia mentre sono al di sopra quelli per il lisozima (Amadori *et al.* 2002). Per quanto riguarda quest'ultimo, forse anche in questo caso la razza influenza in modo determinante i range di riferimento di questo parametro (Ponti *et al.* 1989). Il lisozima è un potente enzima antibatterico in grado di svolgere una azione sinergica con la risposta immunitaria umorale e con i fattori del complemento, la sua titolazione permette di conoscere lo stato di funzionalità del sistema monocitario macrofagico ed è indice di presenza di stati flogistici. La titolazione semiquantitativa del complemento emolitico permette di valutare sia il rischio di insorgenza di forme patologiche infettive che la gravità di una patologia già in atto; mentre la determinazione della battericidia è un parametro molto importante per saggiare l'attività del sistema immunitario non specifico. Per quanto riguarda, inoltre, i valori di lisozima e complemento questi risentono in maniera significativa del tipo di trattamento cui gli animali sono sottoposti ($P < 0.05$ e < 0.005 rispettivamente). I valori di PAO ed di ROMs (trasformati da mM a mg/dl), espressione dello stato ossidativo, sono risultati lievemente superiori ai dati riportati da altri autori (Brambilla *et al.* 2002, Bernabucci *et al.* 2002). Il potere antiossidante del siero risulta adeguato in tutti i gruppi e quindi probabilmente in grado di compensare i valori di ROMs che sono risultati superiori rispetto ai dati bibliografici, sebbene non verificati in questa razza. La variazione significativa di questi parametri nel gruppo C non è facilmente interpretabile tenendo conto del fatto che lo stato ossidativo, visti i valori elevati di PAO, non sembra compromesso. In conclusione, avendo ottenuto dei valori che potrebbero essere utilizzati come riferimento per animali di razza chianina con stato ossidativo adeguato e/o "compensato", sarebbe da un lato opportuno integrare questi dati con quelli relativi al periodo dell'interparto e dall'altro interessante valutare questi parametri nei vitelli e/o in animali selenio carenti.

Tabella1 - valori medi e ds dei parametri considerati nei diversi gruppi di animali.

a,b,ab: lettere differenti indicano variazioni significative ($P < 0.05$).

Table 1 - means and s.d. of parameters investigated in different animal groups:

legenda: a,b,ab different letters indicate significant variations ($P < 0.05$).

	Unità di misura	A ds	B ds	C ds	P<
Lisozima	$\mu\text{g/ml}$	4.8 a 2.3	11 b 5.1	6 ab 3.4	0.05
Complemento	CH 50	45 a 10	31b 5.0	31b 8.0	0.005
Battericidia	%	87 14	99 1.0	98 1.5	n.s.
eGSHPX	U/gHb	365 95	412 51	441 80	n.s.
PAO	$\mu\text{molHClO}$	372 a 39	324 ab 39	293 b 55	0.05
ROMs	mM H ₂ O ₂	8.5 a 1.2	7 ab 0.5	4.6 b 2.4	0.001

BIBLIOGRAFIA – REFERENCES

- Amadori M., Archetti I.L., Frassinelli M., Bagni M., Olzi E., Caronna G., Lanterni M., 1997. J. Vet. Med. B. 44, 321-327
- Amadori M. Archetti I.L., La valutazione del benessere nella specie bovina- Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche – Brescia, 2002
- Barta V., Barta O., 1993. Testing of Hemolytic Complement and its components. In: Barta O., (ed.) Vet. Cl. Imm. Lab., Bar-Lab, Blacksburg, USA
- Beghelli D.; Paeselli M., Morgante M., Spaterna A., Tesei B., 2000 Atti Fe. Me. S. P. Rum., 235-239
- Bengoumi M., Essamadi K., Charcornac J.P., Tressol J.C., Faye B., 1998. Vet. Res. 29(6):557-565
- Bernabucci U., Ronchi B., Lacetera N., Nardone A., 2002 J. Dairy Sci. 85: 2173-2179
- Brambilla G., Ballerini A., Civitareale C., Fiori M., La valutazione del benessere nella specie bovina- Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche – Brescia, 2002
- Finch J.M. and Turner R.J., 1996 Res. Vet. Sci., 60, 97-106
- Malbe M. Klaassen M., Fang W., Myllys V., Vikerpuur, Nyholm K, Sankari S., Suoranta K., Sandholm M., 1995 J. Vet. Med., 42, 111-121
- Matthes H.D., Prokopyuk T., Pastuschenko V.; Muhammad I., 2002 Berl. Munch Tierarztl Wochenschr. 11-15
- Osserman E.F. Lawlor D.P., 1996 J. Exp. Med. 124, 921- 952
- Politis I., Hidiroglou N., White J.H., Gilmore J.A., Williams S.N., Scherf H., Friegg M. 1996 AJVR, Vol., 57, 4, 468-472
- Pollock J.M., McNair J., Kennedy S., Kennedy D.G., Walsh D.M., Goodall E.A., Mackie D.P. and Crockard A.D. *et al.*, 1994 Res. Vet. Sci., 56, 100-107
- Ponti W., Amadori M., Agnoletti F., Bonizzi L., Peri E., Caldora C., 1989. J. Vet. Med. B, 36, 402-408
- Smith L.K., Hogan J.S., Weiss W.P., 1995 Atti XXX Simposio Internazionale di Zootecnica 315 - 325
- Sordillo L.M., Shafer-Weaver K., DeRosa D., 1997 J. Dairy Sci., 80: 1851-1865
- SPSS, 2003.SPSS ®12.0 Guida introduttiva, SPSS Inc. Chicago, IL
- Stephens L.C., McChesney A.E. and Nockels C.F., 1979 Br. Vet. J. 135, 291-293.

EFFECTS OF VITAMIN E AND SELENIUM ADMINISTRATION ON NATURAL IMMUNE RESPONSE AND OXIDATIVE STATUS IN CHIANINA BEEF CATTLE

Moscatti L. (1), Beghelli D. (2), Valbonesi A. (2), Sensi M. (1), Mangili P.M. (1), Marchi S. (1), Battistacci L. (1)

ABSTRACT - Several AA described the influence of proper nutrition on animal ability to fight diseases. and a number of studies on the effects of deficiencies or imbalance of micronutrients in the process of infection and immune-modulatory properties were carried out. The aim of this work was to investigate the effect of Se and Vit. E administration on some natural immune responses of beef cattle at the 8th month of gestation.

KEYWORDS: Chianina cattle, No specific immunity, eGSHPX, PAO, ROMs

INTRODUCTION

Chianina beef cattle are selected based on their growth performance, precocity and killing out percentage. Due to fast growth, deficiencies caused by an unbalanced diet may occur. Recently, several researchers were able to establish a correlation between microelements or vitamins deficient and/or unbalanced diets as well as a higher incidence of diseases because of a minor animal ability to modulate immune responses (Sordillo et al 1997). Many publications are available on the influence exerted by vit E and Se on the immunomodulation in both milk cows and ewes (Pollock et al, 1994; Malbe *et al.* 1995; Politis *et al.*, 1996; Beghelli et al, 1995; Finch *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1995). Regarding beef animals, besides the well known integration influence on myodystrophy a higher resistance to *E.coli*, *Pasteurella Chlamydia* infection and to some gastro-enteric disorders was seen in lambs from ewes that had received integration during gestation. As a consequence, a lower mortality in new-borns and in one month lambs was recorded (Stephens *et al.*, 1979). This study was carried out on Chianina beef cattle with the aim to evaluate VitE and Se integration effects/influence on a number of natural immunity parameters like semi-quantitative complement titration, serum lysozyme titration, serum bactericidal activity, on eGSHPX activity, ROMs and their derivatives in serum as well as on PAO measurement.

MATERIALS AND METHODS

Three Chianina herds located in the middle Tiber valley, were investigated. They were considered as uniform for what concerning environment and orogeographic conditions. All the farms adopted a semi-extensive system and the animals were fed with in farm produced forages. Due to the problems of muscular dystrophy in new-borns calves, two different strategies for vit. E and Se integration were adopted in the first two herds. In the first herd salt bricks were used 8 Maxi RED Lick-Agrolabo (sodium chloride and magnesium oxide with addition of ferric oxide, zinc oxide, manganous oxide, pentahydrated cupric sulphate, potassium iodide, basic carbonate of monohydrated cobalt and sodium selenite); in the second one parenteral administration of 10 ml Selevit Fatro (sodium selenite, vit. E, vit. B12, vit. B1, sorbitol) were given 40 and 30 days before presumptive delivery date. In each of this two herds 5 cows at 8th month of gestation were tested (group A and B). In the 3rd herd, without any symptom of myodystrophy, 10 cows at the same month of pregnancy were tested (group C). Because the animals in this farm didn't received any integration with vitamin E and selenium, it was considered "as control" herd. All animals were blood sampled before feeding using vacuum tubes containing lithium-heparin and no anticoagulant. Serum was collected in small aliquots and stored at -80 °C until used to evaluate non-specific immunity parameters values, ROMs and PAO. Whole blood samples was stored at -20°C and used to establish eGSHPX activity and haemoglobin concentration. Serum lysozyme concentration was established using the Osserman *et al.* (1996) method; concentration was expressed in micrograms per ml. Serum bactericidal activity was measured using a micro-method and expressed in percentage according to the Amadori *et al.* (1997) method. This consists in evaluating the serum ability to inhibit bacterial growth due to the presence (in serum) both of complement factors and low amounts of natural antibodies. Semi-quantitative titration of the haemolytic complement was carried out according to the method described by Barta (1993) and values were expressed as CH50. These values indicate the animal immune-competence toward environmental pathogens or inflammatory sub-acute or chronic diseases as well as the environmental welfare status. Free oxygen radicals and derivatives (ROMs) and PAO in serum samples were measured using commercial kits (Diacron, Grosseto, Italy) and a spectrophotometer SLT Spectra for microplates (Brambilla 2002). ROMs measurement is based on a spectrophotometer determination of the stain increase obtained in samples after addition of a chromogen solution. The colour intensity is directly related to the ROMs derivatives concentration in serum. PAO measures serum oxidation activity by a known concentration of ipochloric acid solution. The

excess of oxidant factor added and not neutralised by the serum anti-oxidant, is measured by spectrophotometric registration of the colour reaction.

eGSHPX activity using Randox methods and reagents (Randox Laboratories, Crumlin, UK) was measured in an automatic Hitachi 704 analyser. The activity of this enzyme is related to Se haematic and tissue values and it represents a significant index of proper selenium intake by the animal through the diet and an index of the animal response to oral or parenteral administration of the microelement. Collected data were analysed for variance (ANOVA) using statistical program SPSS 12.0 (2003). Bonferroni test was implemented to evaluate multiple comparisons, when the variances between the groups were uniform, or Tamhane test, when they were not.

RESULTS AND DISCUSSION

Mean values and relevant standard deviations recorded for each parameter investigated in different groups of animals are reported in Tab. 1. As shown in the table, eGSHPX values recorded were higher than the standard range values established for the species (Bengoumi *et al.*, 1998) in all groups. This may explain the lack of significant variations in different herds studied. From these results it was inferred that treatment was effective in re-establishing normal values in herd where selenium deficiency was recorded and these last values should be taken as reference intervals for the Chianina breed. As already indicated variations may exist in the reference range for enzymatic activities to establish the oxidative status of the breeds (Matthes *et al.*, 2002). In this study, values recorded for the complement and the bactericidal activity were in agreement with the reference ranges for natural immunity values in cattle (Amadori 2002). Values recorded for lysozime were higher than the given standards (Amadori 2002). An explanation can be found in the different breed investigated. (Ponti *et al.*, 1989). Lysozime is a powerful anti-bacterial enzyme able to exert a synergetic activity towards the humoral immune-response and complement factors. Measurement of lysozime allows knowing the monocitary macrophage system functioning status and it indicates the presence of ongoing inflammatory processes. The semi-quantitative haemolytic complement titration enables establishing the risk of exposure to infections and of an ongoing pathology. Measuring bactericidal activity is very useful to establish the non-specific immune-system activity. From a detailed data analysis it can be seen that meaningful variations recorded for lysozime and complement ($P < 0.05$ and < 0.005 respectively) were determined by the kind of treatment applied. PAO and ROMs (expressed as mg/dl) values were slightly higher than those reported by other AA (Brambilla *et al.* 2002, Bernabucci *et al.*, 2002). Serum anti-oxidant power resulted effective in all groups and it was presumably capable of compensating ROMs values, which resulted higher than data reported in the bibliography. The significant variation of these parameters recorded in group C was not easy to explain, since the oxidative status was not apparently compromised as inferred by the high PAO values found. In conclusion, values obtained could be used as reference values for Chianina breed having an adequate or balanced oxidative status. Therefore, it would be appropriate to integrate such data with those recorded during intercalving period as well as evaluating these parameters in veals and in selenium deficient animals.