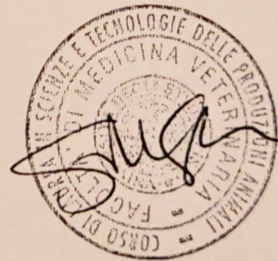
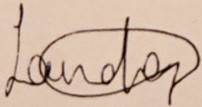


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA
Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie
delle Produzioni Animali

**Valutazione delle proteine di fase acuta
nel cinghiale (*Sus scrofa*)
e
nel camoscio (*Rupicapra pyrenaica*)**

Candidata:

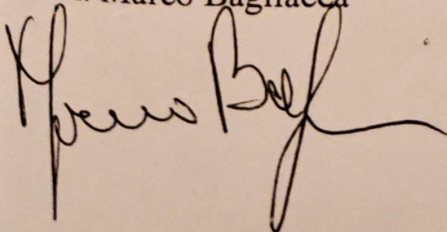
Laura Lopez



Presentato il 23/2/06

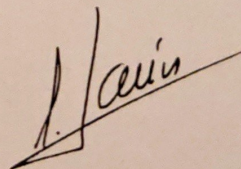
Tutore interno:

Prof. Marco Bagliacca



Tutore esterno:

Prof. Santiago Lavín Gonzalez



COPIA CONFORME

Indice

1. Introduzione	3
2. Obbiettivi	4
3. Revisione bibliografica	6
3.1 Proteine totali e frazioni elettroforetiche	6
3.2 Risposta di fase acuta	9
3.3 Proteine di fase acuta	10
3.4 Caratteristiche generali e applicazione pratica delle principali proteine di fase acuta	13
3.4.1 Aptoglobina	13
3.4.2 Sieroamiloide A	14
3.4.3 Proteina C reattiva	14
3.4.4 Ceruloplasmina	15
3.4.5 α -1 glicoproteina acida	15
3.4.6 Fibrinogeno	16
3.4.7 Altre proteine di fase acuta	17
3.5 Proteine di fase acuta e stress	17
4. Materiale e metodi	21
4.1 Condizioni generali delle prove di laboratorio	21
4.1.1 Raccolta e trattamento dei campioni	21
4.1.2 Macchinari e apparati	25
4.1.3 Descrizione dei metodi utilizzati per la determinazione delle proteine plasmatiche totali e della frazione elettroforetica	27
4.1.3.1 Determinazione delle proteine plasmatiche totali	27
4.1.3.2 Determinazione della frazione elettroforetica	28
4.1.4 Descrizione dei metodi utilizzati per la determinazione delle proteine di fase acuta	30
4.1.4.1 Aptoglobina	30
4.1.4.2 Sieroamiloide A	31
4.1.4.3 Proteina C reattiva	31
4.1.4.4 Pig-MAP	32
4.1.5 Analisi statistica	33

5. Risultati	34
6. Discussione	44
7. Conclusioni	47
8. Bibliografia	48

1. INTRODUZIONE

Le proteine di fase acuta come l'aptoglobina, il seiro amiloide A, la proteina C reattiva, etc. sono proteine plasmatiche la cui concentrazione varia in seguito ad infezioni, flogosi o traumi. Numerosi studi compiuti nell'ultimo decennio hanno dimostrato che la quantificazione delle loro concentrazioni può essere un buon metodo diagnostico complementare al fine di ottenere informazioni sulla detenzione, la prognosi e il monitoraggio di determinate malattie (Eckersall, 2000).

Il profilo di risposta alla fase acuta varia da proteina a proteina e, a sua volta, da specie a specie. Per questo motivo nel corso degli ultimi anni sono stati condotti studi su ogni proteina in relazione alla singola specie cercando, dove possibile, di creare tabelle di riferimento che riportassero le concentrazioni seriche e plasmatiche di base di ciascuna di esse e le alterazioni più frequenti in presenza di malattie o infiammazioni.

Le proteine di fase acuta rispondono a un'ampia serie di fenomeni volti ad alterare l'omeostasi dell'organismo quali flogosi, infezioni batteriche e virali, neoplasie, danni tissutali ma anche gestazione e stress.

Oltre che per diagnosticare malattie tali proteine vengono utilizzate anche per diagnosi di gravidanze precoci o valutazioni sul benessere animale e sul livello di stress al quale l'animale viene sottoposto specialmente in nodi cruciali della catena di produzione quale il macello.

Alle numerose e accurate ricerche condotte sugli animali domestici, da reddito e da compagnia, non si accompagnano studi rilevanti riguardanti gli animali selvatici.

Per questo motivo il nostro gruppo di lavoro ha condotto una serie di studi atti a determinare e valutare le diverse proteine di fase acuta in specie selvatiche ancora poco studiate, come il cinghiale (*Sus scrofa*) e il camoscio (*Rupicapra pyrenaica*).

La determinazione dei parametri proteici basilari (proteine plasmatiche totali e frazioni elettroforetiche) propri della specie, delle principali proteine di fase acuta riscontrate, la definizione dei loro livelli normali e delle alterazioni più evidenti diventeranno la base per una valutazione generale sullo stato di salute e benessere delle popolazioni prese in esame.

2. OBIETTIVI

L'obiettivo primario del progetto è quello di fornire una valutazione delle principali proteine di fase acuta che si incontrano nel cinghiale (*Sus scrofa*) e nel camoscio (*Rupicapra pirenaica*), comparando i valori ottenuti da sieri di animali sani con quelli ottenuti da animali affetti da tubercolosi, nel caso del cinghiale, e da pestivirus, nel caso del camoscio.

Lo studio permetterà di definire i valori basali di dette proteine e le modificazioni che si riscontrano nelle loro concentrazioni sanguigne in caso di risposta acuta a malattie o infezioni.

I soggetti utilizzati per il progetto sono cinghiali e camosci, di diversa età e diverso sesso, catturati in diverse zone della Cataluña (regione nord-orientale della Spagna). Per i soggetti non affetti da tubercolosi o pestivirus, che nel corso della trattazione chiameremo "sani", non è comunque possibile escludere la presenza di altre malattie in quanto non sono state svolte prove sierologiche specifiche.

Il primo step prevede la determinazione dei valori delle proteine plasmatiche totali e delle frazioni elettroforetiche.

- Per determinare la quantità di proteine plasmatiche totali verrà usato il metodo del Biuretto.
- Per ottenere i proteinogrammi si attuerà un'elettroforesi su acetato di cellulosa.
- Le quantità di proteine plasmatiche totali e i proteinogrammi ottenuti verranno poi confrontati fra loro al fine d'evidenziare le differenze esistenti fra soggetti malati e quelli sani.

Il secondo step prevede la determinazione delle proteine di fase acuta:

- Definizione delle proteine di fase acuta più rilevanti per la specie, facendo riferimento alla bibliografia esistente per la fauna domestica;
- Determinazione dei livelli basali di ciascuna di tali proteine tramite analisi specifiche di laboratorio svolte su sieri di animali che non detenevano tubercolosi o pestivirus;
- Determinazione delle modificazioni nelle concentrazioni sanguigne di tali proteine in seguito a risposta di fase acuta. Per tale analisi verranno confrontati i risultati ottenuti da analisi condotte su

campioni provenienti da animali sani con quelli ottenuti da campioni provenienti da animali affetti da tubercolosi o pestivirus.

3. REVISIONE BIBLIOGRAFICA

3.1 PROTEINE PLASMATICHE TOTALI E FRAZIONI ELETTROFORETICHE

Le proteine si possono classificare in base alla loro struttura, alle loro caratteristiche chimiche o al loro comportamento fisico.

La sintesi delle proteine seriche è geneticamente determinata ed è per questo che esistono differenze tra specie e tra individui.

L'età, la gravidanza, la lattazione, il livello di certi ormoni sono tutti fattori che influenzano, in maniera differente, il livello di proteine totali. L'età, per esempio, tende ad aumentare tali livelli, mentre il cortisolo ne provoca una diminuzione in conseguenza del suo effetto catabolico (Kaneko *et al.*, 1997).

In biochimica clinica, l'elettroforesi è la tecnica di riferimento per il frazionamento delle proteine seriche. La separazione elettroforetica di tali proteine si ottiene in virtù del fatto che, le particelle, dotate di carica propria, migrano se poste in un campo elettrico.

La maggior parte delle proteine seriche ha carica negativa e, in acetato di cellulosa in tampone barbitale, migra verso l'anodo. L'albumina, la proteina con carica negativa maggiore, è quella che migra più lontana. Le globuline, dotate di una carica di minor intensità, migrano più lentamente. Le globuline migrano per gruppi classificati in: α , β e γ . Inoltre, ciascun gruppo può essere diviso in frazioni, indicate con indici numerici.

Le α e le β globuline hanno principalmente funzione di trasporto mentre le γ corrispondono alle immunoglobuline (anticorpi). Riguardo alle ultime, è possibile relazionare la quantità di immunoglobuline del siero d'animale con i livelli di γ globulina e, di conseguenza, di proteine.

La lunghezza e la larghezza di ciascuna sezione del proteinogramma indicano la quantità relativa di una determinata proteina o di un gruppo di proteine. Questo può tradursi in una lettura in percentuale e, combinando tali informazioni con la quantità di proteine totali, si possono calcolare i valori assoluti della concentrazione di ciascuna proteina o di ciascun gruppo.

Lo studio del proteinogramma viene anche utilizzato per avvalorare la costanza dei patterns proteici di una determinata specie. Si studia la migrazione elettroforetica delle distinte zone, ricche in

proteina, del siero. Si misura, nel tracciato densitometrico, la distanza orizzontale dal punto di applicazione del campione al picco delle zone ricche in proteina. Siccome l'albumina migra verso l'anodo, le distanze calcolate dal punto d'applicazione in direzione di questo sono positive; quelle verso il catodo sono negative. La distanza dal punto applicazione a cui migra l'albumina viene assunta come 100. La distanza relativa di migrazione delle altre zone ricche in proteine viene calcolata come quoziente tra la distanza della zona determinata e la distanza di migrazione dell'albumina (Osbaldiston, 1972).

Eventuali anomalie riscontrate nel proteinogramma devono essere interpretate sotto la luce di molti fattori influenzanti non associati allo stato di salute. Le fluttuazioni e le variazioni fisiologiche interindividuali sono relativamente frequenti (Kaneko *et al.*, 1997).

Negli ungulati domestici sono stati analizzati diversi tracciati densitometrici di elettroforesi e si è visto che, per esempio, nel bovino, nell'ovino e nel caprino si riscontrano differenze significate nella concentrazione delle diverse frazioni elettroforetiche a seconda dell'età (Keay *et al.*, 1984; Castro, *et al.*, 1977). In genere, in tutti gli animali, con l'avanzare dell'età, si registra un incremento generale delle proteine totali, una diminuzione dell'albumina e un aumento delle globuline (Kaneko, *et al.*, 1997).

Lo stato di salute, più di ogni altro fattore, causa differenze quantitative nelle diverse frazioni proteiche. Aumenti di globuline si registrano anche in caso di malattie epatiche gravi o infettive. Nel caso di quest'ultime sono le γ globuline a subire un maggior incremento. Anche in caso di disidratazione per perdita di liquidi si registra un aumento delle proteine totali in seguito ad emocostrazione; si consta che l'albumina e la globulina crescono in modo proporzionale così da mantenere il loro rapporto (Alb./Glob.) inalterato.

Bassi livelli di proteine totali sono associati, invece, a basse concentrazioni di albumina e a minimi cambi nei livelli delle globuline così che il rapporto Alb./Glob. Diminuisce. Un basso livello di albumina può essere dovuto a perdite elevate di questa con l'urina, a diminuzioni di sintesi epatica o a un'ingestione proteica insufficiente (Castro *et al.*, 1977).

Numerosi studi sono stati condotti anche su animali selvatici, per lo più ungulati.

Nel cervo, per esempio, si è visto che nel maschio le proteine totali aumentano con l'età, in seguito ad un incremento di β e γ globuline; stessa cosa avviene per i daini femmina e per i caprioli di entrambi i sessi (Kent *et al.*, 1980; McDougall e Lowe, 1968; Reid e Towers, 1985; Wilson e Pauli, 1982; Ursache *et al.*, 1980). Nel muflone e nella capra montana si è invece notato un diverso aumento di concentrazione di proteine totali in seguito a diversi metodi di cattura (Marco *et al.*, 1997; Peinado *et al.*, 1993). Nel cervo axis si è inoltre visto che le femmine, in condizioni normali, hanno livelli di proteine totali e γ globulina superiori rispetto ai maschi (Chappel *et al.*, 1991).

Sono ormai note le concentrazioni di proteine plasmatiche totali e delle varie frazioni elettroforetiche in quasi tutti gli animali, domestici e selvatici.

La tabella seguente riporta i valori di riferimento delle principali specie domestiche.

Tabella 3.1: Valori basali di proteine totali e varie frazioni elettroforetiche nelle principali specie domestiche.

	Bovino	Ovino	Caprino	Suino	Equide	Canide	Felino
Proteine totali (g/l)	71.0±1.8	72.0±5.2	69.0±4.8	84.0±5.0	63.5±5.9	61.0±5.2	66.0±7.0
Albumine (g/l)	32.9±1.3	27.0±1.9	33.0±3.3	25.9±7.1	30.9±2.8	29.1±1.9	27.0±1.7
Globulina (g/l)	32.4±2.4	44.0±5.3	36.0±5.0	58.6±5.7	33.3±7.1	34.0±5.1	39.0±6.9
Glob α (g/l)	7.9±0.2	5.0±1.0	6.0±0.6				
Glob α_1 (g/l)				3.8±0.6	1.9±2.6	3.0±0.3	7.0±0.2
Glob α_2 (g/l)				14.1±1.3	6.5±1.3	6.0±2.1	7.0±0.2
Glob β (g/l)	9.6±0.8						
Glob β_1 (g/l)		10.0±1.4	9.0±1.0	2.3±1.0	9.2±3.0	8.2±2.3	7.0±0.3
Glob β_2 (g/l)		7.0±2.6	4.0±0.2	14.7±2.1	5.7±1.1	8.9±3.3	7.0±0.2
Glob γ (g/l)	19.7±1.4		17.0±4.4	23.5±1.1	0.0±1.4		
Glob γ_1 (g/l)		16.0±4.1				8.0±2.5	16.0±7.7
Glob γ_2 (g/l)		8.0±3.0				7.0±1.4	17.0±3.6

(Kaneko, 1997)

Tabella 3.2: Valori basali di proteine totali e varie frazioni elettroforetiche nelle principali specie selvatiche.

	Cervo	Camoscio	Mufone	Daino
Proteine totali (g/l)	65.0±6.0	50.0±6.0	52.0±8.0	61.0±4.0
Albumine (g/l)	38.6±4.9	27.0±4.0	26.0±6.0	39.0±6.0
Globulina (g/l)	27.7±7.7	23.7±8.3	25.0±9.3	19.6±7.5
Glob α_1 (g/l)	2.8±1.2	1.7±0.9	2.2±0.7	2.1±0.8
Glob α_2 (g/l)	4.8±1.0	4.1±1.2	5.9±2.4	3.1±0.9
Glob β (g/l)	7.7±1.3	4.6±2.2	3.6±0.7	6.5±3.2
Glob γ (g/l)	12.4±4.2	13.0±4.0	13.3±5.5	7.9±2.6

(Lastras *et al.*, 1999; Marco *et al.*, 1999)

3.2 RISPOSTA DI FASE ACUTA

Con il termine “risposta di fase acuta” (Acute Phase Response, APR) si intende la reazione prodotta dall’organismo a determinati disturbi, quali infezioni, danni tissutali, neoplasie o disordini immunologici, volti ad alterarne l’omeostasi.

Le principali funzioni di questa risposta sistemica sono (Whicker e Westacott, 1992):

- Distribuire al meglio energia e substrati disponibili per la lotta ai patogeni invasori;
- Evitare il trasferimento di metaboliti che potrebbe essere utili ai patogeni;
- Limitare il danno causato dai patogeni e/o eliminare il tessuto danneggiato o infettato e restaurare il tessuto sano (Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

Durante la risposta di fase acuta vengono liberate ad opera di macrofagi e monociti giunti nel sito di flogosi o di infezione delle citochine proinfiammatorie.

Alla liberazione di tali citochine segue, grazie alla loro azione paracrina, un incremento sistemico del livello generale delle interleuchine, che andrà a stimolare la risposta di fase acuta del fegato.

Le principali citochine coinvolte sono (Martínez-Subiela *et al.*, 2001):

- Interleuchina-1- β (IL-1- β)
- Interleuchina-6 (IL-6)
- Tumor necrosis factor- α (TNF- α)

Queste citochine stimolano il fegato a produrre proteine di fase acuta tramite tre diversi meccanismi che variano in base al tipo di citochina coinvolta:

- La **IL-6** si unisce al suo recettore specifico provocando la fosforilazione del fattore di trascrizione, che si dirige verso il nucleo dove funge da mediatore per la trascrizione dei geni che codificano la produzione di proteine di fase acuta.
- La **IL-1- β** e il **TNF- α** si uniscono ai loro rispettivi recettori e causano la degradazione del fattore inibente il fattore di trascrizione, permettendone così la produzione e la conseguente attivazione dei geni di fase acuta nel nucleo della cellula.
- A loro volta la **IL-6** e il **TNF- α** stimolano la liberazione di ACTH, incrementando così la liberazione di glucocorticoidi da parte delle ghiandole adrenali.

I glucocorticoidi esercitano una doppia funzione, apparentemente contraddittoria e non ben conosciuta: da una parte incrementano l'effetto delle citochine sul fegato, dall'altra stabilizzano i monociti inibendo così la liberazione di citochine proinfiammatorie (Heinrich *et al.*, 1990).

Oltre ai meccanismi sopra descritti, e' stato dimostrato, in seguito ad esperimenti, che anche lo stress fisico e psicologico induce un aumento di IL-6 in circolo e di conseguenza un incremento delle proteine di fase acuta (Deak *et al.*, 1997; Nukina *et al.*, 2001).

Nonostante tale meccanismo di induzione non sia ancora ben chiaro, si pensa che la stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-adrenale ad opera dei segnali da stress possa essere un fattore scatenante per la produzione locale o sistemica di citochine, alla quale segue l'aumento della sintesi epatica delle proteine di fase acuta e il successivo rilascio in circolo (Murata *et al.*, 2004).

3.3 PROTEINE DI FASE ACUTA

Le proteine di fase acuta (Acute Phase Protein, APP) sono un gruppo di proteine plasmatiche che cambiano in concentrazione negli animali soggetti a disturbi interni od esterni quali infezioni, infiammazioni, traumi operatori o stress (Murata *et al.*, 2003).

Tali proteine si possono classificare secondo due criteri: il tipo di risposta quantitativa successiva allo stimolo e la funzione biologica svolta.

Secondo il tipo di variazione del loro livello in seguito a stimolazione si distinguono in:

1- Proteine di fase acuta negative: sono quelle il cui livello va diminuendo quando si produce una risposta di fase acuta (Heinrich *et al.*, 1990).

In questo gruppo si trovano proteine come albumina, prealbumina e transferrina.

2- Proteine di fase acuta positive: sono quelle il cui livello va aumentando quando si produce una risposta di fase acuta.

A loro volta le proteine di fase acuta positiva vengono divise, in base all'intensità della loro reazione, in tre gruppi:

- Proteine a intensità minore, i cui livelli aumentano del 50%;
- Proteine a intensità moderata che presentano incrementi pari a 2 o 3 volte la loro concentrazione normale;
- Proteine a intensità maggiore che presentano rapidi aumenti fino a 1000 volte la loro concentrazione normale (Martinez-Subiela *et al.*, 2001).

Le diverse proteine di fase acuta si comportano in modo differente di fronte ad una flogosi ed esistono inoltre variazioni nella risposta di fase acuta a seconda della specie animale (Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

In generale la sintesi delle proteine di fase acuta si trova ad essere stimolata tra le 6 e le 8 ore dopo l'inizio della reazione infiammatoria per raggiungere un picco di livello tra i 2 e i 5 giorni (Jain, 1989).

Le proteine che subiscono un maggiore incremento sono differenti a seconda della specie. Negli animali domestici da compagnia le più significative variazioni di concentrazione si registrano per la proteina C reattiva (CRP), l'aptoglobina e la ceruloplasmina nella specie canina e per l' α -1 glicoproteina acida (AGP) in quella felina. Negli animali domestici da reddito si considerano invece l'aptoglobina e l'amiloide A sierico per bovini e ovini, la CRP e la Pig Major Acute phase Protein (Pig-MAP) per i suini e l'amiloide A sierico per gli equini. Per i polli è stata individuata una proteina di fase acuta positiva, la transferrina, che aumenta notevolmente le proprie concentrazioni in corso di fenomeni flogistici (Martínez-Subiela *et al.*, 2001; Martínez-Subiela *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2004; Eckersall, 2000; Paltrinieri, 2005). Per gli animali da laboratorio è stato definito un ampio range di proteine di fase acuta di riferimento. Per il coniglio, studi in vivo e in vitro hanno messo in evidenza la CRP, l'AAS, l'aptoglobina e la ceruloplasmina come proteine di fase acuta positive e l'albumina come negativa (Anderson *et al.*, 1951; Mackiewicz *et al.*, 1988). Nel topo invece si ricercano l'aptoglobina, l' α -1-glicoproteina acida, la porzione c-3 del complemento e l'AAS, tutte proteine di fase acuta positive (Prose *et al.*, 1989).

Per misurare tali variazioni di concentrazione non esistono in bibliografia livelli normali o valori di riferimento per ogni specifica proteina di fase acuta di tutte le specie.

E' necessario che, prima di condurre un determinato studio, ogni laboratorio definisca un proprio intervallo di riferimento per ciascuna proteina e specie in esame (Martínez- Subiela *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2004).

Tabella 3.3: Principali proteine di fase acuta nelle differenti specie animali (Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

SPECIE	PRINCIPALI APP (aumenti >100volte)	PRINCIPALI APP (aumenti di 2-3volte)
Bovino	Aptoglobina,SAA	AGP, α 1-antitripsina
Ovi-caprino	Aptoglobina,SAA	AGP
Suino	CRP,pig-MAP	Aptoglobina
Equide	SAA	CRP,Fibrinogeno
Canide	CRP, aptoglobina	Ceruloplasmina
Felino	AGP	
Lagomorfo	CRP, AAS	Aptoglobina, ceruloplasmina
Murino	Aptoglobina, AGP	Porzione 3 del complemento,AAS

SAA= amiloide A sierico; CRP= proteina C reattiva; AGP= α -1-glicoproteina acida

Nell'ultimo decennio il dosaggio delle proteine di fase acuta e' stato utilizzato, in medicina veterinaria, come metodo di controllo dello stato di salute e di benessere degli animali domestici, sia da reddito che da compagnia (Eckersall, 2000).

Alcuni studi sono stati condotti anche sulla fauna selvatica. Nel cinghiale, per esempio, è stata dimostrata, in caso di malattie caratterizzate da infiammazione cronica, quale la tubercolosi, la presenza di un deposito di materiale amiloidico in fegato, reni e intestino (Segalés *et al.*, 2005) anche se non sono state condotte analisi per la valutazione della concentrazione sanguinea dell' sieroamiloide A. In Canada il dosaggio di alcune proteine di fase acuta, come la proteina C reattiva, l'aptoglobina, la ceruloplasmina e la transferrina, e' stato utilizzato per determinare il livello di stress causato, negli orsi bruni, dalla cattività e per verificare quali effetti producesse sull'ibernazione (Tsiouris *et al.*, 2004).

Differenze nella concentrazione sierica di tali proteine rivela la presenza di un disordine d'omeostasi dell'organismo, sia esso dovuto a malattie, traumi, attacchi batterici e parassitari o semplicemente a gravidanze o stress.

La risposta che viene attivata e' tuttavia aspecifica e non del tutto puntuale.

Sebbene il disordine venga messo in evidenza, non e' possibile determinare la causa che l'ha generato e inoltre, per alcune proteine che necessitano di un ampio intervallo di tempo per raggiungere il picco, non e' possibile stabilire quando con esattezza si sia verificata l'alterazione (Murata *et al.*, 2004).

Numerosi studi stanno comunque evolvendosi in tale direzione (Martínez-Subiela *et al.*, 2001; Eckersall, 2000; Murata *et al.*, 2004). Si pensa infatti che in un futuro le analisi effettuate sulle proteine di fase acuta potranno avere un'applicazione pratica in molti campi, come la valorizzazione dello stato sanitario dell'animale, la detenzione di processi subclinici, il monitoraggio di trattamenti farmacologici, le diagnosi precoci di gravidanza, i controlli sanitari al macello, la monitorizzazione e la valutazione del benessere degli animali e del livello di stress a cui vengono sottoposti (Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

3.4 CARATTERISTICHE GENERALI E APPLICAZIONE PRATICA DELLE PRINCIPALI PROTEINE DI FASE ACUTA

3.4.1 APTOGLOBINA

E' una glicoproteina plasmatica che presenta una struttura tetramericata formata da due subunita' α combinate con due subunita' β . Forma un complesso stabile con l'emoglobina alla quale si lega specificatamente (Makimura e Suzuki, 1980). Tale complesso viene rapidamente eliminato dal circolo sanguigno ad opera del sistema reticolo endoteliale (Elson, 1974).

L'aptoglobina agisce come una proteina di fase acuta positiva in numerose specie come bovini, ovini, suini e equidi. Viene coinvolta in fenomeni di immunoregolazione in quanto abile ad inibire la blastogenesi dei linfociti (Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

La sua concentrazione sanguigna aumenta tra le 24 e le 48 ore che seguono un intervento, un'infezione batterica o virale, una tossinfezione, traumi, mastiti, parti e aborti. Si innalza inoltre in animali soggetti a stress di qualunque tipo: da trasporto, da macello, da clima, ecc...(Thomas, 2000).

3.4.2 SIEROAMILOIDE A

E' un apolipoproteina che durante la risposta di fase acuta si coniuga con le proteine ad alta densita'.

E' una APP positiva. La sua concentrazione cresce da quattro a quaranta volte nelle 24 ore che seguono l'alterazione e rimane elevata per 4-6 giorni per poi ritornare a livelli basali entro 2-4 settimane (Thomas, 2000).

La concentrazione si eleva in seguito a interventi chirurgici, infezioni batteriche e virali, traumi, flogosi e stress fisico. In bovini e ovini è un buon metodo di screening per le mastiti cliniche e subcliniche (Martínez-Subiela *et al.*, 2001; Eckersall, 2000).

3.4.3 PROTEINA C REATTIVA

E' una proteina appartenente alla famiglia delle pentraxine ed e' formata da cinque subunita' identiche unite da legami non covalenti.

E' una APP positiva. La concentrazione sale velocemente tra le 24 e le 48 ore che seguono l'alterazione (Thomas, 2000).

E' stata isolata e caratterizzata per la prima volta a partire da siero bovino, anche se, proprio in questa specie, non registra variazioni considerevoli durante la risposta di fase acuta.

Da notare che la sua concentrazione aumenta nel latte di animali affetti da mastiti, così che viene usata come marcatore infiammatorio per il controllo dello stato delle mammelle.

Nel suino viene considerata una delle principali proteine di fase acuta, in quanto la risposta a stimoli quali interventi, infezioni batteriche o virali, inoculazioni sperimentali di agenti inerti e' assai rapida.

Riveste una particolare importanza anche nell'equino, in quanto reagisce marcatamente e velocemente in seguito ad insorgere di artriti e pneumoniti (Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

3.4.4 CERULOPLASMINA

E' una glicoproteina atta al trasporto della maggior parte del rame circolante. Ogni molecola trasporta da 6 a 8 atomi di rame secondo la specie animale considerata.

E' una APP positiva. Incrementi nella concentrazione si verificano nei 3-4 giorni seguenti a flogosi e infezioni e nei 4-6 giorni seguenti interventi chirurgici e, in entrambi i casi, restano elevati per alcune settimane (Thomas, 2000).

Si tratta di una proteina di fase acuta i cui incrementi di concentrazione plasmatici, in caso di infiammazione, sono lievi in ruminanti, suini e equini (Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

Nei bovini si riscontrano aumenti di concentrazione in caso di infezioni da pasteurelle, herpesvirus o mastiti. Viene inoltre utilizzata per monitorare l'evoluzione dell'involuzione uterina e in caso di metriti.

Nel suino si riscontrano aumenti in caso di infezione da *Tenia solium* o di flogosi (Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

3.4.5 α -1-GLICOPROTEINA ACIDA

E' una proteina di fase acuta positiva altamente glicosilata che possiede un alto contenuto di acido sialico. Gioca un ruolo nella risposta immunitaria inibendo la blastogenesi dei linfociti e la produzione di anticorpi.

I suoi livelli crescono in risposta a flogosi tissutale, traumi o ferite in molte specie animali, tra cui bovini e equini.

Gli incrementi si riscontrano tra le 24 e le 72 ore che seguono l'inizio della flogosi, operazioni chirurgiche, somministrazione di endotossine, e ritornano normali in 2-3 settimane (Thomas, 2000).

Nel bovino i valori si elevano in seguito a flogosi acute e subacute, infezioni batteriche, mastiti.

Nel cavallo si riscontrano picchi in seguito al parto e a malattie infiammatorie in generale.

Nel suino indicano processi infiammatori in corso e si riscontrano in malattie infettive quali meningiti e pneumoniti (Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

E' da notare che questa proteina di fase acuta non subisce incrementi in seguito a stress, specialmente quello da trasporto (Murata *et al.*, 1993).

3.4.6 FIBRINOGENO

E' una glicoproteina formata da due subunita', ciascuna delle quali e' formata da tre catene polipetidiche interconnesse da ponti disolfuro.

Generalmente circola nel plasma a livelli uniformi. Durante la fase acuta di una infiammazione viene liberata in maggior quantita' dagli epatociti, così che i suoi livelli aumentano sensibilmente.

E' una APP positiva. Aumenti di fibrinogeno si riscontrano entro 2 giorni dall'inizio del disturbo (Thomas, 2000).

Tali livelli aumentano in seguito a flogosi, infezioni, traumi e neoplasie e sono utili a fini di monitoraggio soprattutto in bovini e equidi (Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

Il fibrinogeno e' senza dubbio la proteina di fase acuta piu' studiata, tanto che sono stati definiti i valori normali di fibrinogeno nel sangue delle specie di maggior interesse veterinario (Jain, 1989).

Tabella 3.4: Valori normali di fibrinogeno nelle specie di maggior interesse veterinario.

Specie	Valore minimo (mg/dl)	Valore massimo (mg/dl)
Bovina	300	700
Suina	100	500
Ovina	100	500
Caprina	100	400
Equina	100	500

Da notare che i livelli di fibrinogeno aumentano sensibilmente se l'animale viene sottoposto a stress fisico, anche se ancora non si e' dimostrata nessuna correlazione tra l'aumento di fibrinogeno e quello di cortisolo in circolo (Thomas, 2000).

3.4.7 ALTRE PROTEINE DI FASE ACUTA

Esistono altre proteine di fase acuta, considerate secondarie per le specie domestiche, che meritano comunque di essere menzionate in quanto potrebbero invece rivestire un ruolo significativo per diagnosi su animali selvatici o di altro genere.

A questo gruppo appartengono:

- **Albumina:** APP negativa, che evidenzia, col diminuire della propria concentrazione plasmatica, un disagio dell'organismo dovuto per lo più a problemi renali, epatici, di malassorbimenti e a risposte di fase acuta associate ad un elevata produzione di globulina;
- **Prealbumina:** APP negativa e positiva, a seconda delle specie e dei fattori scatenanti. Nel cane la sua concentrazione decresce in seguito a malnutrizione, interventi, traumi ed infezioni. Nel cavallo invece la concentrazione aumenta in seguito ad infezioni, laminiti e neoplasie, in modo inversamente proporzionale rispetto all'albumina;
- **Ferritina:** APP che presenta sia incrementi (in caso anemie emolitiche o eccessiva somministrazione di ferro) che decrementi (in caso di carenza di ferro o emorragie croniche) della propria concentrazione plasmatica in specie diverse come la canina e l'equina. E' una delle APP che non risponde agli stimoli da stress.
- **Transferrina:** APP negativa la cui concentrazione decresce negli equidi che presentano laminiti ed infezioni varie e nei suini infettati da *Salmonella choleraesuis*. Solo in un caso, nei polli, funziona come APP positiva in risposta alle infiammazioni (Murata, 2004). Non risponde agli stimoli da stress.
- **α_1 -Antitripsina:** AAP positiva. Le sue concentrazioni aumentano, nella specie canina, in seguito a traumi, infiammazioni, interventi; nella specie bovina e' un indicatore per mastiti cliniche, per lo più dovute a *P. haemolitica* (Thomas, 2000).

3.5 PROTEINE DI FASE ACUTA E STRESS.

Con il termine stress vengono descritte tutte quelle situazioni che provocano un disequilibrio o una tendenza al disequilibrio all'interno dell'organismo (Cannon, 1935). In seguito ad un avvenimento "stressante" il surrene libera adrenalina e glucocorticosteroidi, sotto il controllo dell'adenoipofisi (si parla di coinvolgimento dell'asse ipofisario-adrenocorticale e simpatico-adrenomidollare). La

risposta di fase acuta ad uno stimolo di stress viene definita "Sindrome generale di adattamento" (General Adaptation Syndrome, GAS, descritta da Selye nel 1946) e, discernendo dal tipo di stimolo e dalla sua intensità, si articola sempre in tre fasi:

- Reazione d'allarme, in cui l'organismo percepisce le alterazioni fisiologiche e biochimiche;
- Fase di resistenza, in cui l'organismo cerca di adattarsi progressivamente al cambiamento;
- Fase di esaurimento, in cui crollano tutte le reazioni organiche, sottoposte ad uno stimolo troppo prolungato.

In breve, l'organismo percepisce l'alterazione dell'omeostasi ad opera del sistema nervoso centrale, mette in atto una risposta di fase acuta che porta a determinati cambiamenti fisici e biochimici che conducono in primo luogo ad uno stato di preinfermità e, solo dopo il collasso delle resistenze, alla malattia (Kagan *et al.*, 1974).

La percezione dello stimolo, la risposta di fase acuta ed i cambiamenti fisico-biochimici che si verificano variano da soggetto a soggetto in virtù della specie, del sesso, dell'età, dello stato di salute, del temperamento e della personalità dell'individuo stesso.

Si suole distinguere due tipici atteggiamenti di risposta allo stimolo da stress: una risposta attiva di "lotta o fuga", caratterizzata dall'aumento dell'attività simpatico-adrenomidollare e da un'attivazione comportamentale, e una risposta passiva di "conservazione e ritirata", caratterizzata da un aumento dell'attività adrenocorticale e da un'inibizione comportamentale (Henry *et al.*, 1977).

La risposta allo stress include una componente comportamentale e una fisiologica, che portano entrambe alla liberazione di CRH (Corticotropin-Releasing Hormone) da parte del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo e del nucleo centrale dell'amigdala (Dunn *et al.*, 1990).

La principale risposta comportamentale attuata dall'animale è lo spostamento volontario. Lo spostamento in un luogo più sicuro e tranquillo è la risposta più semplice e biologicamente più economica. Se lo spostamento però non si dimostra sufficiente l'animale realizza altri comportamenti come emettere versi o correre (Moberg, 1987).

Le principali risposte fisiologiche invece si rendono manifeste grazie a precisi "indicatori fisiologici" che tendono a variare in risposta ad uno stress.

Tali indicatori comprendono: la frequenza cardiaca (Broom *et al.*, 1993; Hofer, 1970; Gebrielsen *et al.*, 1977; Espmark *et al.*, 1985; Spodick, 1980), la temperatura corporea (Spraker, 1982), i parametri sanguigni e l'emogramma (Franzmann *et al.*, 1975; Wesson *et al.*, 1979; Kocan *et al.*, 1981; Cross *et al.*, 1988; DelGiudice *et al.*, 1990; Brelurut, 1991), la quantità di proteine totale (Kaneko, 1997b), la concentrazione enzimatica (Duncan *et al.*, 1986; Spraker, 1993) e di metaboliti quali l'urea e la creatinina (Wolkers. *et al.*, 1994; Le Resche *et al.*, 1974; Seal *et al.*, 1978; Sealander, 1975; Hyvärinen *et al.*, 1976; Kock *et al.*, 1987), la concentrazione di zuccheri (Kaneko, 1997a) e di colesterolo (Bruss, 1997) la distribuzione di elettroliti (Di Bartola, 1992; Carlson, 1997; Bia, 1981; DeLiberto *et al.*, 1989; DelGiudice *et al.*, 1992) e la liberazione di ormoni (Mason, 1968a/b; Thurley *et al.*, 1973, Viñas *et al.*; 1989; Hargreaves *et al.*, 1990, Sanhoury *et al.*, 1992; Franzmann *et al.*, 1975; Seal *et al.*, 1978; Hastings *et al.*, 1992, Morton *et al.*, 1995).

Da inserire tra i parametri di valutazione è inoltre il dosaggio delle concentrazioni sanguigne di alcune proteine di fase acuta, per le quali sono stati dimostrati un effettivo aumento o diminuzione di tali concentrazioni in seguito a stimoli di stress.

Le variazioni di concentrazione di SAA, CRP, aptoglobina, ceruloplasmina e fibrinogeno sono le più rilevanti ai fini di tale studio e ad esse vanno aggiunte lievi variazioni nelle concentrazioni di ferritina, complemento, albumina e prealbumina.

Nel 1995 Hanselgeest e colleghi dimostrano che la concentrazione di SAA aumenta notevolmente e proporzionalmente all'intensità dello stress in bovini soggetti a diversi livelli di stimoli stressanti (Hanselgeest *et al.*, 1995). Due anni dopo venne dimostrato anche il coinvolgimento dell'aptoglobina e dell'AGP nella risposta di fase acuta allo stress. Infatti, in ratti da laboratorio soggetti a diversi stimoli stressanti, venne riscontrato un notevole aumento nelle concentrazioni di tali proteine (Deak *et al.*, 1997).

Tra il 2000 e il 2003 numerosi studi sono stati condotti specialmente nel bovino ribadendo che, il già citato SAA, è la proteina di fase acuta più adatta a valutare il livello di stress e benessere di tali soggetti (Arlington *et al.*, 2003).

Nel 2004 viene dimostrato che nel suino è la CRP la proteina di fase acuta più adatta a valutare il livello di stress e benessere, in quanto molto sensibile a stimoli di stress, specialmente quelli da

trasporto e da fame. Si riscontrano nel bovino effettivi aumenti anche nella concentrazione di aptoglobina (Peterson, 2004).

Nel 2005 l'attenzione si posa anche su altre proteine di fase acuta che rispondono allo stress aumentando il proprio livello, come ceruloplasmina, ferritina, complemento, o diminuendolo, come albumina e prealbumina (Ferril, 2005).

4. MATERIALI E METODI

4.1 CONDIZIONI GENERALI DELLE PROVE DI LABORATORIO

4.1.1 RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Per quanto riguarda il cinghiale, i campioni di sangue sono stati raccolti da soggetti abbattuti durante battute di caccia condotte in diverse zone della Catalunya. Il sangue è stato raccolto durante necroscopie svolte in loco. Una volta ucciso l'animale, si è cercato di raggiungerlo il più velocemente al fine di ottenere campioni di buona qualità. Da animali raggiunti in meno di mezz'ora è stato possibile raccogliere campioni di sangue intero tramite prelievo intracardiaco. Nei soggetti raggiunti in tempi successivi è stato solo possibile raccogliere liquido sanguinolento da cavità toracica o addominale.

Il materiale raccolto è stato quindi introdotto in tubi privi di sostanze anticoagulanti. I tubi sono stati posti in una borsa frigo e portati, in un tempo che varia dalla due alle quattro ore, al laboratorio dove i campioni sono stati sottoposti a una centrifugazione a 3500 giri/min per 15 minuti, al fine di ottenere il siero. Il siero ottenuto è stato in seguito posto in provette Eppendorf e congelato a -20°C .

Sono state condotte analisi immunologiche su tutti i sieri raccolti così da discriminare i soggetti affetti da tubercolosi da quelli sani e individuare la specie di micobatterio responsabile dell'infezione.

Per condurre lo studio sono stati selezionati campioni di siero congelato sia di animali infetti che di animali sani. Sono stati scelti i sieri che presentavano le migliori condizioni di conservazione. Infatti, poiché gli animali al momento del prelievo erano già morti, la maggior parte dei sieri presenta un qualche grado di emolisi.

Selezionare campioni che presentino un grado d'emolisi nullo o basso è importante al fine di evitare alterazioni del proteinogramma.

L'emolisi, infatti, tende ad alterare la lettura delle differenti frazioni elettroforetiche aumentando il picco della α_2 globuline e occultando in parte quello della β globuline.

L'emoglobina che viene liberata, in seguito alla lisi cellulare, segue due destini: una parte si lega all'aptoglobina formando complessi emoglobina-aptoglobina che si uniscono alle α_2 globuline incrementandone il picco al momento della lettura; una parte, che rimane libera, si unisce alle β globuline occultando una parte di picco.

È importante, al momento dell'interpretazione dei dati, tenere in conto questo fattore e considerare che le concentrazioni di α_2 globuline e β globuline potrebbero essere state alterate e portare a conclusioni errate (Amog, V.M. et al., 1977).

Tabella 4.1: Sieri di animali sani.

Numero di referenza	Luogo di ritrovamento	Sesso	Età	Peso	Tipo di campione	Qualità del campione
SS 28/04	Tuixen	Femmina	Adulta	~ 43Kg	Sangue intero	Buono
SS 34/04	La Guingueta	Maschio	Piccolo	~ 10Kg	Sangue intero	Buono
SS 42/04	Alt Urgell	Maschio	Giovane	~ 12Kg	Sangue intero	Buono
SS 01/05	Freser-Setcases	Maschio	Giovane	~ 15Kg	Sangue Intero	Buono
SS 30/05	Freser-Setcases	Maschio	Adulto	~ 60Kg	Sangue Intero	Buono
SS 39/05	Alt Pallars-Aran	Femmina	Adulta	~ 40Kg	Sangue intero	Buono
SS 58/05	Cerdanya	Femmina	Adulta	~ 55Kg	Sangue intero	Buono
SS 60/05	Freser-Setcases	Maschio	Adulto	~ 50Kg	Sangue intero	Buono
SS 63/05	Fontsamargoes Cova Alta	Femmina	Adulta	~ 35Kg	Sangue intero	Lievemente emolitico
SS 69/05	Clot de l'hospital	Femmina	Subadulta ~ 9 mese	~ 35Kg	Sangue intero	Buono
SS 70/05	Ports Tortosa Beseit	Maschio	Subadulto 8-9 mesi	~ 35Kg	Sangue intero	Buono
SS 71/05	Ports Tortosa Beseit	Femmina	Subadulta 8-9 mesi	~ 30Kg	Sangue intero	Buono con lieve Lipemia
SS 73/05	Ports Tortosa Beseit	Maschio	Subadulto 7-8 mesi	~ 24Kg	Sangue intero	Buono
SS 87/05	Barranco de Lloret	Femmina	Giovane		Liquido sanguinolento	Lievemente lipemico e emolitico
SS 91/05	Barranco de Lloret	Maschio	Giovane		Liquido sanguinolento	Buono con lieve Lipemia
SS102/05	Gramella Cova Alta	Maschio	Adulto	~ 40Kg	Liquido sanguinolento	Buono con lieve Lipemia

Tabella 4.2: Sieri di animali infetti da *M. bovis*:

Numero di referenza	Luogo di ritrovamento	Sesso	Età	Peso	Tipo di campione	Qualità del campione
SS 17/05	Barranco de Lloret	Femmina	Adulta	~ 55Kg	Sangue Intero	Buono
SS 61/05	Barranco de Lloret	Femmina	Adulta	~ 35Kg	Sangue Intero	Buono
SS 66/05	Mas del Cansalader	Femmina	Subadulta	~ 15Kg	Sangue Intero	Lievemente emolitico
SS 68/05	Mas del Cansalader	Femmina	Subadulta ~ 6 mesi	~23,5Kg	Sangue Intero	Lievemente emolitico
SS 79/05	Mas del Cansalader	Femmina	Adulta	~ 45Kg	Sangue Intero	Lievemente emolitico
SS 89/05	Barranco de Lloret	Femmina	Adulta		Liquido sanguinolento	Buono con lieve Lipemia
SS 90/05	Barranco de Lloret	Femmina	Adulta		Liquido sanguinolento	Buono con lieve Lipemia
SS 92/05	Barranco de Lloret	Femmina	Adulta		Liquido sanguinolento	Lievemente Emolitico
SS 93/05	Barranco de Lloret	Femmina	Adulta		Liquido sanguinolento	Lievemente Emolitico

Per quanto riguarda il camoscio i campioni sono stati raccolti da animali vivi trasportati, in condizioni di salute precarie, all'università o prelevati durante catture svolte sui Pirenei catalani. Gli animali sono stati catturati con delle reti tese nei fondo valle, al confine con zone boschive. Gli animali che, messi in fuga da una battuta, rimanevano bloccati nella rete, venivano prelevati, legati e trasportati in un luogo pianeggiante dove venivano sottoposti a controlli di routine.

Il sangue è stato prelevato dalla vena giugulare ed è stato inserito in tubi privi di sostanze anticoagulanti. I tubi sono stati poi inseriti in una borsa frigo e trasportati, in tempi inferiori alle quattro ore, al laboratorio dove sono stati sottoposti a una centrifugazione a 3500 giri/min per 15 minuti, al fine di ottenere il siero. Il siero ottenuto è stato in seguito posto in provette Eppendorf e congelato a -20°C.

Anche in questo caso per le analisi di laboratorio sono stati scelti sieri che presentavano buone condizioni di conservazione e gradi d'emolisi nulli o comunque molto lievi.

N 16

Tabella 4.3: Sieri da animali sani.

Numero di referenza	Luogo di ritrovamento	Sesso	Età	Peso	Tipo di campione	Qualità del campione
RP C-01	Fontalba	Maschio	3 anni	25 Kg	Sangue Intero	Lievemente Emolitico
RP C-02	Fontalba	Femmina	1 anni	15 Kg	Sangue Intero	Lievemente Emolitico
RP C-03	Fontalba	Maschio	5 anni	22 Kg	Sangue Intero	Lievemente Emolitico
RP C-04	Fontalba	Maschio	5 anni	28,5 Kg	Sangue Intero	Buono
RP C-05	Fontalba	Femmina	4 anni	20 Kg	Sangue Intero	Lievemente Emolitico
RP C-06	Fontalba	Femmina	5 anni	26 Kg	Sangue Intero	Buono
RP C-07	Fontalba	Femmina	11 anni	28,25 Kg	Sangue Intero	Buono
RP C-08	Fontalba	Femmina	3 anni	25,1 Kg	Sangue Intero	Lievemente Emolitico
RP C-09	Fontalba	Femmina	8 anni	24,58 Kg	Sangue Intero	Abbastanza Emolitico
RP C-27	Els Orris	Femmina	1,5 anni	20 Kg	Sangue Intero	Lievemente Emolitico
RP C-11	Fontalba	Femmina	2 anni	16,7 Kg	Sangue Intero	Lievemente Emolitico
RP C-12	Fontalba	Maschio	1 anno	14,3 Kg	Sangue Intero	Lievemente Emolitico
RP C-13	Fontalba	Maschio	2 anni	16,9 Kg	Sangue Intero	Buono
RP C-14	Fontalba	Maschio	1 anno	Indeterm.	Sangue Intero	Buono
RP C-17	Fontalba	Maschio	3 anni	21,4 Kg	Sangue Intero	Buono
RP C-22	El orris	Maschio	8 anni	31 Kg	Sangue Intero	Buono
RP C-25	El orris	Maschio	3 anni	31 Kg	Sangue Intero	Buono

Tabella 4.4: Sieri da animali affetti da pestivirus:

Numero di referenza	Luogo di ritrovamento	Sesso	Età	Peso	Tipo di campione	Qualità del campione
RP 04/05	La llosa Cerdanya	Femmina	8 anni	17 Kg	Sangue Intero	Lievemente emolitico
RP 13/05	UAB	Femmina	5 anni	13 Kg	Sangue Intero	Buono
RP 15/05	Parque del Cadi	Femmina	4 anni	17 Kg	Sangue Intero	Buono
RP 16/05	Parque del Cadi	Femmina	6-7 anni	15,8 Kg	Sangue Intero	Buono lievemente Emolitico
RP 28/05	Val d'Aram	Maschio	6 anni	23,6 Kg	Sangue Intero	Lievemente Emolitico
RP 32/05	Parque del Cadi	Maschio	11 anni	22,2 Kg	Sangue Intero	Buono
RP 33/05	Parque del Cadi	Maschio	6-7 anni	16,3 Kg	Sangue Intero	Buono
RP 37/05	Freser-Setcasas	Maschio	11 anni	22,4 Kg	Sangue Intero	Buono

4.1.2 Macchinari e apparati

Di seguito sono indicati i macchinari utilizzati nelle differenti prove realizzate e ne vengono descritte, in modo generalizzato, le principali caratteristiche:

- Olympus AU-400 autoanalyser (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Germany). È un analizzatore completamente automatizzato usato per analisi immunologiche e di routine. La macchina possiede un sistema fotometrico dotato di tredici diverse lunghezze d'onda che fornisce letture densitometriche accurate in tempi variabili fra i 40 secondi e gli 8 minuti. Tutti i dati ottenuti dalla lettura fotometrica vengono automaticamente registrati su un software Windows-NT dove vengono confrontati coi valori standard in memoria, processati e restituiti quantificati.
- BTS-100 (Electrophoresis Power Supply, BioSystem, S.A, Costa Brava, Spagna). È una fonte d'alimentazione per elettroforesi. Fornisce un voltaggio stabile e regolabile alle cuvette di migrazione usate per la separazione elettroforetica delle proteine su strisce di acetato di cellulosa. È costituito da tre parti fondamentali:
 - Il circuito generatore del voltaggio, situato all'interno della struttura.

- Una tastiera con i comandi necessari per la programmazione della macchina e uno schermo dove si trovano le luci segnaletiche e dove è possibile verificare i dati introdotti.
 - Un temporizzatore con allarme programmabile con intervalli di un minuto. Una volta finalizzato il ciclo programmato disconnette la tensione in uscita e attiva un segnale acustico.
- BTS-245 (BioSystems, S.A., Costa Brava, Spagna). È un fotodensitometro di precisione utilizzato per la lettura delle differenti frazioni proteiche. Essendo le frazioni proteiche debitamente colorate, l'apparato è in grado di localizzare le differenti bande proteiche e quantificarle mediante la misurazione dell'assorbanza. È costituito da :
- Una tastiera e un telecomando a rotella per la programmazione della macchina e uno schermo a cristalli liquidi per la visualizzazione delle opzioni inserite e la restituzione dei dati elaborati.
 - Un vassoio porta strisce nel quale vengono inserite le strisce colorate al momento della lettura densitometrica.
 - Sistema ottico ad alta risoluzione (20 bits) con uno spettro fotometrico da 400 a 700 nm. La fonte luminosa è una lampada alogena da 6V/10W, il rivelatore è un fotodiodo di silicio.
 - Sistema elettronico per l'analisi e la restituzione dei dati. Costituito da un microprocessore Hitachi H8/3003 a 16 bits, unità di memoria FLASH e SRAM, un orologio interno, una stampante.
- Autoanalizzatore Cobas Mira Plus (abx, Abx diagnostic, Montpellier, France).
È un autoanalizzatore multiparametrico selettivo costituito da quattro parti fondamentali:
- Pannello di controllo, dove è collocato tutto il sistema informatico. È la zona dove si programmano le analisi da realizzare e dove alla fine si processano i risultati.
 - Braccio pipettatore. Si tratta di un braccio motorizzato che si sposta per pipettare reagenti e campioni. Possiede un sistema di pipettamento costituito da due aghi: uno standard per grandi volumi di reattivo e uno più piccolo per microquantità di reattivo o campione.
 - Piattaforma refrigerata per bacinelle. L'apparato utilizza bacinelle per reattivi, calibratori, controlli e campioni. Esistono diversi tipi di bacinelle che vengono

identificate, di volta in volta, in forma automatica dal sistema mediante un codice binario.

- Analizzatore propriamente detto, composto da un fotometro con cinque filtri differenziali, una lampada di Xenon, un vassoio per cuvette che permette di caricare fino a 6 segmenti portanti 12 cuvette ciascuno e un sistema di controllo della temperatura.

➤ Victor 1420 multilabel counter (Pelkinelmer Lifesciences, Wallac, Turku, Finland). Si tratta di una piattaforma completa per la detenzione quantitativa di marcatori radioattivi o fonoassorbenti. È adeguato per luminescenza, fluorescenza, fotometria e fluorometria a tempo ritardato. Nelle misurazioni di assorbenza (fotometria) la luce si origina da una lampada alogena di tungsteno ad onde continue. Detta luce passa attraverso i pozzetti della placca e raggiunge un fotodiodo situato sotto la medesima. La lunghezza d'onda della luce deve rimanere in un range di 340 e 700 nm.

4.1.3 Descrizione dei metodi utilizzati per la determinazione delle proteine plasmatiche totali e della frazione elettroforetica

4.1.3.1 Determinazione delle proteine plasmatiche totali

Per la determinazione delle proteine plasmatiche totali è stato usato il metodo del Biureto. La lettura è stata effettuata con un autoanalizzatore modello Olympus AU-400 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Germany).

Il reagente Biureto è stato ottenuto prendendo 1,8g di sodio potassio tartarato, 0,6g di rame solfato $*5H_2O$, 1g di potassio iodato, dissolvendo il tutto, in maniera ordinata e sequenziale, in 200ml 0,2 M di idrossido di sodio e aggiungendo acqua distillata fino ad ottenere un volume di 200 ml.

Sono poi stati aggiunti 9ml di reagente a tubi da analisi ciascuno contenente 1ml di un diverso campione preventivamente diluito in proporzione 1:10 mg/ml con soluzione tampone. I tubi sono stati centrifugati alcuni secondi e lasciati a riposo per 20 minuti.

La concentrazione è stata letta dall'autoanalizzatore a 550nm di lunghezza d'onda.

4.1.3.2 DETERMINAZIONE DELLA FRAZIONE ELETTROFORETICA

Per la determinazione della frazione proteica è stato usato l'apparato BTS (ByoSystems, S.A., Costa Brava, Spagna) costituito da una fonte d'alimentazione per elettroforesi (BTS-100) e da un fotodensitometro (BTS-245). È stato seguito il seguente protocollo d'elettroforesi:

Reattivi: tampone da elettroforesi; colorante Nero Amido; decolorante Nero Amido (450ml di acqua distillata+ 50ml di acido acetico+ 500ml di metanol anidro); trasparentatore (da preparare al momento dell'uso: 33ml di Ciclohexanona+ 867ml di metanol anidro (A)+ 100ml di acido acetico (B) per 1l; 9ml di A+ 1ml di B per ogni striscia).

Materiali: Strisce di acetato di cellulosa, fonte d'alimentazione, camera di migrazione (cavi e ponti); applicatore e portaoggetti; bacinella (per effettuare la colorazione); ginocchio e placca di vetro; pinze, guanti e essiccatore (o stufa).

Procedimento: È stata riempita la camera di migrazione con il tampone da elettroforesi fino al livello indicato e vi sono state totalmente immerse le strisce di acetato di cellulosa, che dovevano essere utilizzate per la prova, con la faccia assorbente rivolta verso il basso (l'angolo tagliato era disposto in basso a sinistra) per 10-20 minuti. Le strisce che non sono state utilizzate sono state conservate immergendole in metanolo al 40%.

Passato il tempo necessario, le strisce sono state estratte e l'eccesso di tampone è stato eliminato ponendole tra due pagine di carta da filtro. Una volta asciugate, sono state marcate per poterle poi differenziare durante l'analisi (sono stati applicati piccoli tagli o fori).

Le strisce umide sono state ben tese sopra il ponte collocando la faccia assorbente verso l'alto (disponendo l'angolo tagliato in basso a destra o in alto a sinistra).

Il ponte è stato collocato nella camera di migrazione facendo attenzione che gli estremi delle strisce fossero in contatto con il tampone.

Una volta aggiustato il voltaggio a 200 V e impostata la durata intorno ai 35 minuti si è attaccata la fonte d'alimentazione iniziando così la corsa elettroforetica. Particolare attenzione è stata rivolta all'ampereaggio, bisogna infatti fare sempre in modo che rimanga costante, intorno a 2mA/striscia.

Una volta completata la migrazione è stata disconnessa la fonte d'alimentazione, le strisce sono state ritirate e sono state poste 5 minuti in una bacinella sommerse in colorante Nero Amido con la faccia assorbente rivolta verso il basso. Per evitare che si sovrapponevano è stato necessario agitare delicatamente la bacinella. Dopo 5 minuti le strisce sono state rimosse e lavate più volte col decolorante fino a che l'ultimo risciacquo è apparso limpido e il fondo della striscia completamente bianco.

Sono state poi disidratate ponendole 1 minuto a bagno nel metanolo, agitando costantemente. Dopo di che sono state immerse nel trasparentatore dove sono state mantenute in agitazione per 1-2 minuti.

In seguito sono state disposte con attenzione sopra una placca di vetro (con la faccia assorbente a contatto col vetro), ed ogni eventuale bolla d'aria è stata eliminata con un rullo.

Per ultime le strisce sono state asciugate in una stufa (60-70°C, 3-4min) fino a che non sono risultate completamente trasparenti. Prima di procedere alla lettura sono state lasciate a raffreddare a temperatura ambiente.

Quantificazione densitometrica: Per quantificare le diverse bande proteiche ottenute le strisce sono state inserite nel densitometro preventivamente programmato secondo il tipo di lettura desiderata. Il densitometro ha restituito in pochi minuti una curva rappresentante le diverse frazioni proteiche.

4.1.4 DESCRIZIONE DEI METODI UTILIZZATI PER LA DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE DI FASE ACUTA

4.1.4.1 APTOGLOBINA

Per la determinazione di tale proteina è stato utilizzato il kit commerciale Tridelta Phasetm range serum haptoglobin (Tridelta Development Limited, Ireland), realizzando tutte le determinazioni per duplicato nell'autoanalizzatore di biochimica Cobas Mira Plus (ABX diagnostic Montpellier, France).

Si tratta di una prova colorimetrica basata sulla determinazione dell'attività perossidasi dei complessi aptoglobina-emoglobina a pH acido, sviluppata da Eckersall *et al.* (1999). I procedimenti analitici realizzati dall'autoanalizzatore si possono riassumere nel seguente modo (figura 1):

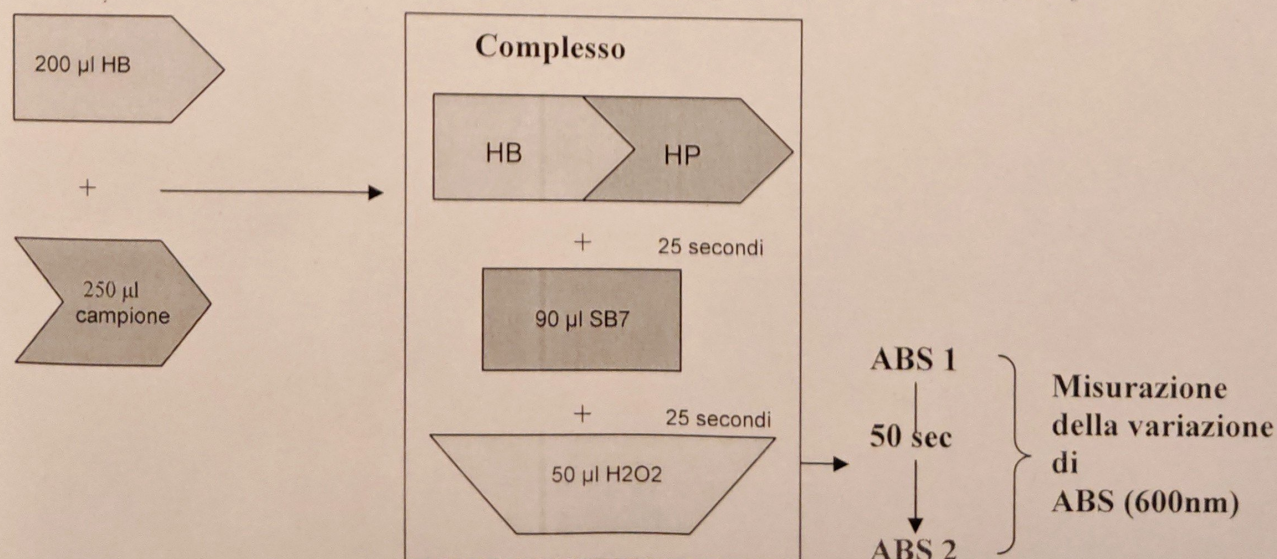
-Inizialmente 2,5 µl di campione o di soluzione standard vengono mescolati con 200 µl della soluzione di lavoro (emoglobina stabilizzata mescolata in ugual proporzione con il diluente fornito dal kit).

-Dopo 25 secondi si aggiungono 90 µl di cromogeno (SB7).

-Dopo altri 25 secondi si aggiungono 50 µl di substrato (H₂O₂)

L'incremento di assorbanza che si produce durante i 50 secondi che seguono l'aggiunzione del substrato è misurata a 600 nm e viene utilizzata per calcolare la curva di calibratura che permetterà di determinare la concentrazione di aptoglobina in campioni di concentrazione sconosciuta. I campioni che superano l'assorbanza standard devono essere diluiti in proporzione 1:5 con il diluente fornito dal kit (Martínez-Subiela, 2003).

Figura 1: Schema dei procedimenti seguiti nell'analisi dell'aptoglobina (Martínez-Subiela, 2003).



4.1.4.2 SIEROAMILOIDE A

I livelli di questa proteina sono stati determinati mediante il kit Tridelta Phasetm Range Serum Amyloid A Assay (Tridelta Development Limited, Ireland).

L'analisi è un' ELISA di tipo "sandwich". Tale test contiene strisce di microtitolazione che preventivamente sono state ricoperte con anticorpi monoclonali specifici per l' sieroamiloide A.

I passi da seguire per realizzare l'analisi sono i seguenti:

- Prendere i campioni e diluirli 1:500 con il diluente fornito dal kit; introdurli nei pozzetti dove preventivamente erano stati fatti aderire gli *anticorpi anti-ASS biotinilati* e incubare per 1 ora a 37°C. Qualunque molecola di amiloide presente nei campioni rimane adesa alla piastra in seguito alla formazione del reticolo antigene/anticorpo.
- Lavare bene i pozzetti così da eliminare il materiale che non si è unito e aggiungere il siero monoclonale coniugato contenente Streptavidin-Horse Radish Peroxidasa.
- Dopo un periodo di incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente si lava nuovamente e si aggiunge *tetrametilbenzidina (TMB)*. Si lascia ancora ad incubare 30 minuti a temperatura ambiente.
- Aggiungere la soluzione di "stop" (fornita dal kit) per finalizzare la reazione.

L'intensità del colore prodotta è proporzionale alla concentrazione di sieroamiloide A presente nel campione originale. Detta intensità di colore viene misurata a 450nm con un lettore ottico Victor 1420 (PelkinElmer Lifesciences, Wallac, Turku, Finland) (Martínez-Subiela, 2003)

4.1.4.3 PROTEINA C REATTIVA

I livelli di CRP vengono determinati con il kit commerciale Tridelta Phasetm CRP kit (Tridelta development limited, Ireland).

L'analisi condotta è un' ELISA di tipo sandwich. I passi base per compiere l'analisi sono i seguenti:

- Prendere i campioni e diluirli 1:500 con il diluente fornito dal kit; introdurli in micropozzetti preventivamente ricoperti con anticorpi anti-CRP e incubare 15 minuti a 37°C.
- Lavare bene i micropozzetti per eliminare il materiale che non si è unito e aggiungere il siero monoclonale coniugato, formato da anticorpi anti-CRP marcati con Horse Radish Peroxidasa

(HRP) e incubare nuovamente 15 minuti a 37°C. In questo modo l'anticorpo immobilizzato fisserà in modo specifico la CRP presente nel pozzetto.

-Lavare nuovamente, aggiungere *tetrametilbenzidina* e lasciare 15 minuti in incubazione a temperatura ambiente. Questo reattivo è un cromogeno con attività perossidasi e permetterà di quantificare la quantità di CRP presente nei campioni.

-In seguito si aggiunge una soluzione stop (fornita dal kit) per finalizzare la reazione e si misura l'assorbanza a 450nm con il lettore ottico Victor 1420 multilabel counter (Martínez-Subiela, 2003).

4.1.4.4 PIG-MAP

I livelli di Pig-MAP vengono determinati con il kit commerciale Pig-MAP kit ELISA (PigCHAMP Pro Europa SA, Segovia, Spagna).

L'analisi condotta è un' ELISA di tipo sandwich. I passi base per compiere l'analisi sono i seguenti:

- Prendere i campioni e diluirli 1:500 con il diluente fornito dal kit; introdurli in micropozzetti preventivamente ricoperti con anticorpi anti-Pig-MAP e incubare 30 minuti a temperatura ambiente (20°-24° C).

- Lavare bene i micropozzetti per eliminare il materiale che non si è unito e aggiungere il siero monoclonale coniugato, formato da anticorpi anti- Pig-MAP marcati con Perossidasi e incubare nuovamente 30 minuti a temperatura ambiente. In questo modo l'anticorpo immobilizzato fisserà in modo specifico la Pig-MAP presente nel pozzetto.

-Lavare nuovamente, aggiungere ad ogni pozzetto 100 µl di substrato cromogeno e lasciare che si sviluppi il colorazzurro per circa 30 minuti in incubazione a temperatura ambiente. Questo reattivo è un cromogeno con attività perossidasi e permetterà di quantificare la quantità di CRP presente nei campioni.

-In seguito si aggiunge una soluzione stop (fornita dal kit) per finalizzare la reazione e si misura l'assorbanza a 450nm con il lettore ottico Victor 1420 multilabel counter (Martínez-Subiela, 2003).

4.1.5 ANALISI STATISTICA

I risultati ottenuti sono stati processati con i programmi informatici Excell 2000 (Microsoft corporation) e SPSS. I metodi statistici utilizzati sono:

- Descrittivo. Media e Deviazione standard.
- Prove di Normalità (Prova di Kolmorov-Smirnov e prova di Shapiro-Wilk).
- Test parametrici (T di Student) per popolazioni che presentano una distribuzione normale.
- Test non parametrici (Prova di Mann-Whitnay e prova di Kolmorov-Smirnov) per popolazioni che presentano una distribuzione non normale.

5. RISULTATI

Valori delle proteine plasmatiche totali e delle frazioni elettroforetiche.

Nelle tabelle 5.1 e 5.2 vengono riportati i dati risultanti dall'analisi statistica eseguita per i valori di proteina plasmatica totale e delle frazioni elettroforetiche ottenuti tramite le prove di laboratorio descritte nei capitoli precedenti.

Nei grafici viene mostrata la distribuzione della popolazione rispetto ad ogni parametro preso in considerazione.

Per quanto riguarda il cinghiale (tab.5.1) non risultano differenze significative tra il gruppo di animali sani e quello di animali affetti da tubercolosi.

Nel camoscio (tab.5.2) una differenza significativa appare per la α_{1b} globulina.

Tabella 5.1: Valori di proteine plasmatiche totali e frazioni elettroforetiche ottenuti da sieri di cinghiali sani e cinghiali affetti da tubercolosi.

Parametri	Cinghiali sani (n=16)			Cinghiali infetti (n=9)			Sign.
	Media	DS	Range	Media	DS	Range	
Proteine totali (g/l)	67.87	7.88	63.67-72.07	75.23	10.65	67.04-83.42	N.S.
Albumine (g/l)	31.08	4.35	28.76-33.40	34.58	4.36	31.23-37.93	N.S.
Glob α (g/l)	11.17	2.74	9.70-12.64	9.59	3.22	0-5.12	N.S.
Glob β_1 (g/l)	4.29	0.95	3.78-4.79	4.17	1.25	3.20-5.13	N.S.
Glob β_2 (g/l)	7.59	2.07	0.47-7.42	9.37	2.63	3.54-9.15	N.S.
Glob γ (g/l)	13.74	2.9971	12.14-15.34	16.18	3.61	13.41-18.95	N.S.

n= numero di animali presi in esame; DS= deviazione standard; Sig=significatività; N.S.=valore non significativo; *=valore significativo con $p < 0.005$.

Grafico 5.1 e 5.2: Grafici di distribuzione delle proteine plasmatiche totali nel cinghiale.

Grafico 5.1

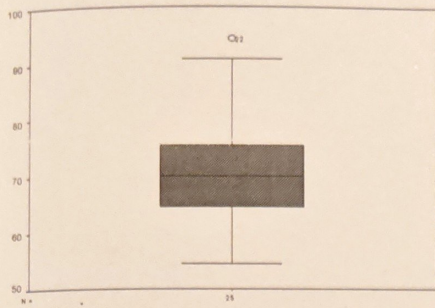


Grafico 5.2

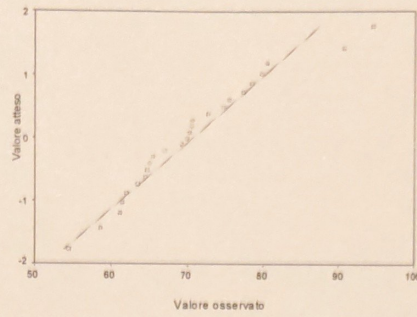


Grafico 5.3 e 5.4: Grafici di distribuzione dell'albumina nel cinghiale.

Grafico 5.3

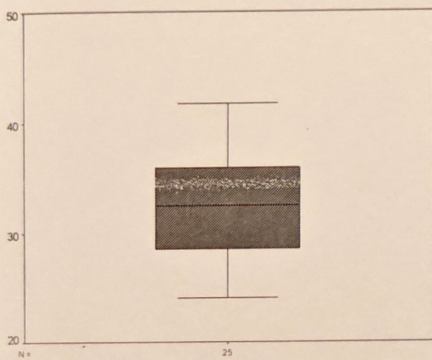


Grafico 5.4

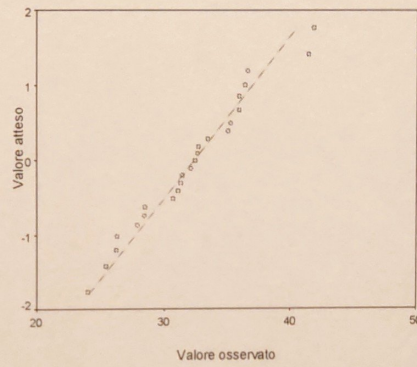


Grafico 5.5 e 5.6: Grafici di distribuzione delle α globuline nel cinghiale.

Grafico 5.5

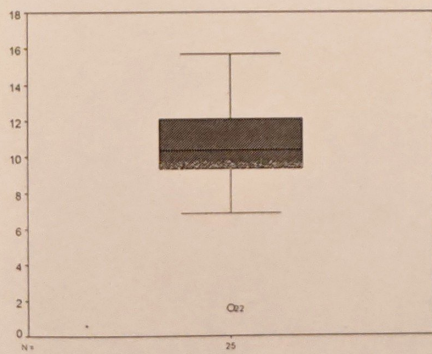


Grafico 5.6

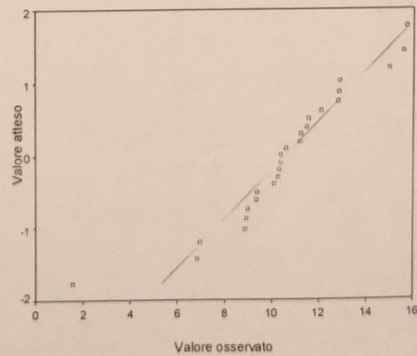


Grafico 5.7 e 5.8: Grafici di distribuzione delle β_1 globuline nel cinghiale.

Grafico 5.7

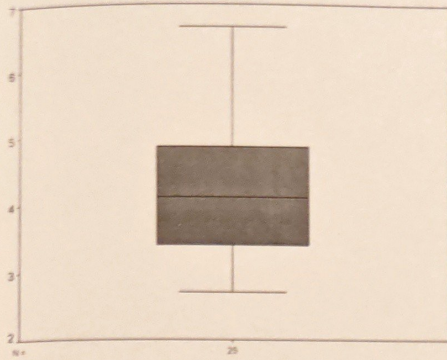


Grafico 5.8

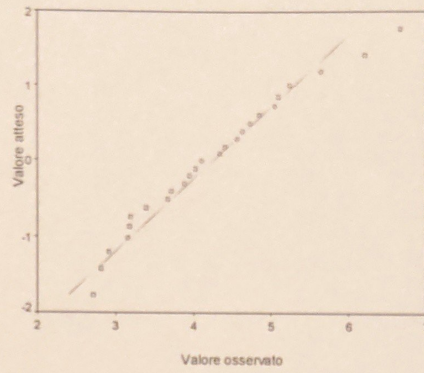


Grafico 5.9 e 5.10: Grafici di distribuzione delle β_2 globuline nel cinghiale.

Grafico 5.9

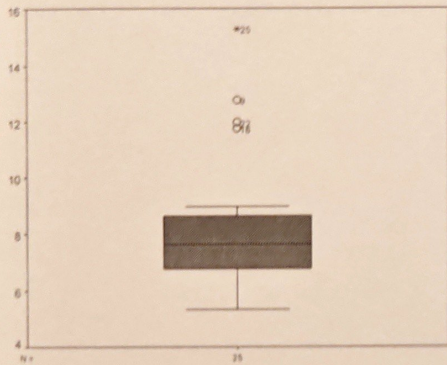


Grafico 5.10

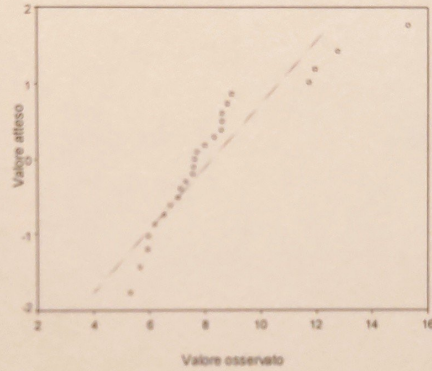


Grafico 5.11 e 5.12: Grafici di distribuzione delle γ globuline nel cinghiale.

Grafico 5.11

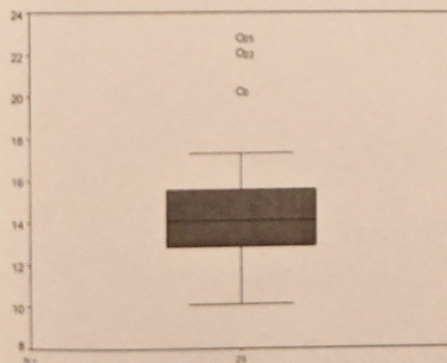


Grafico 5.12

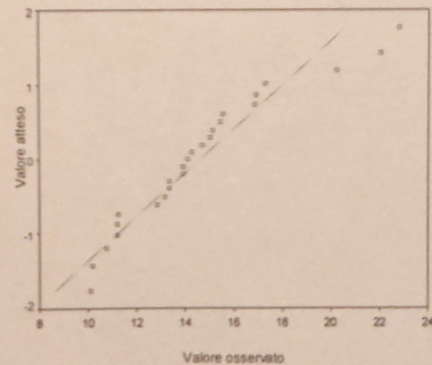


Tabella 5.2: Valori di proteine plasmatiche totali e frazioni elettroforetiche ottenuti da sieri di camosci sani e camosci affetti da pestivirus.

Parametri	Camosci sani (n=17)			Camosci infetti (n=8)			Sign.
	Media	DS	Range	Media	DS	Range	
Proteine totali (g/l)	60.65	12.92	54.00-67.29	59.31	9.45	51.41-67.22	N.S.
Albumine (g/l)	32.53	6.25	29.32-35.75	28.77	4.06	25.37-32.16	N.S.
Glob α_{1a} (g/l)	1.13	0.42	0.41-1.18	1.05	0.26	0.21-1.28	N.S.
Glob α_{1b} (g/l)	2.47	0.87	2.02-2.92	3.80	0.95	3.00-4.60	*
Glob α_2 (g/l)	3.79	1.07	3.24-4.34	4.42	1.00	3.58-5.26	N.S.
Glob β_1 (g/l)	2.95	0.83	2.53-3.38	2.95	0.88	2.21-3.68	N.S.
Glob β_2 (g/l)	3.70	1.92	2.49-3.68	4.74	1.73	3.30-6.19	N.S.
Glob γ (g/l)	14.19	5.57	0-23.70	13.58	8.64	2.78-71.78	N.S.

n= numero di animali presi in esame; DS= deviazione standard; Sig=significatività
N.S.=valore non significativo; *=valore significativo con $p < 0.005$.

Grafico 5.13 e 5.14: Grafici di distribuzione delle proteine plasmatiche totali nel camoscio.

Grafico 5.13

Grafico 5.14

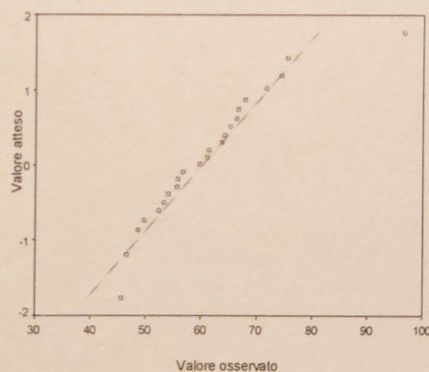
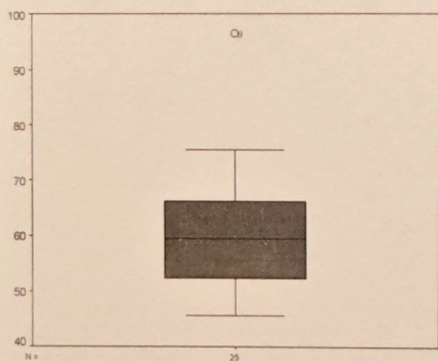


Grafico 5.15 e 5.16: Grafici di distribuzione dell'albumina nel camoscio.

Grafico 5.15

Grafico 5.16

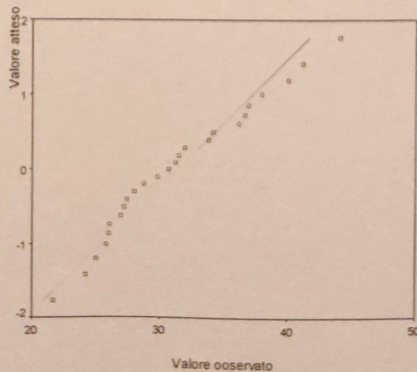
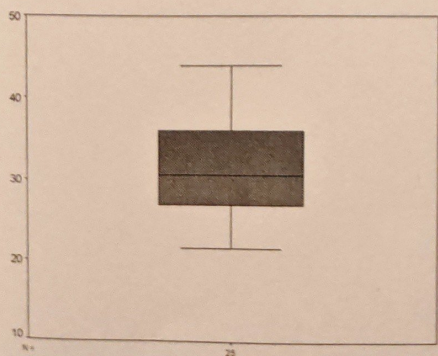


Grafico 5.17 e 5.18: Grafici di distribuzione delle α_{1a} globuline nel camoscio.

Grafico 5.17

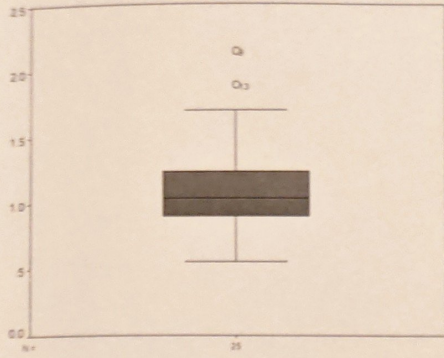


Grafico 5.18

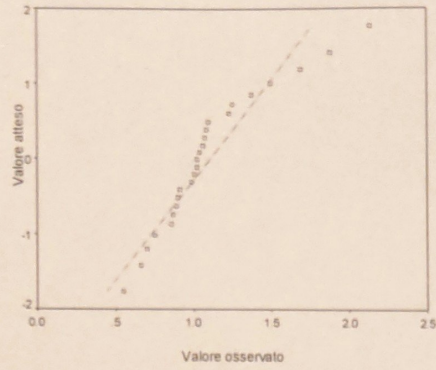


Grafico 5.19 e 5.20: Grafici di distribuzione delle α_{1b} globuline nel camoscio.

Grafico 5.19

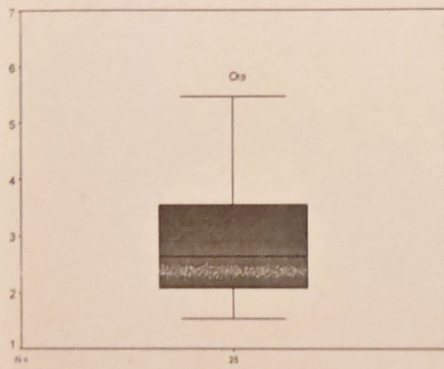


Grafico 5.20

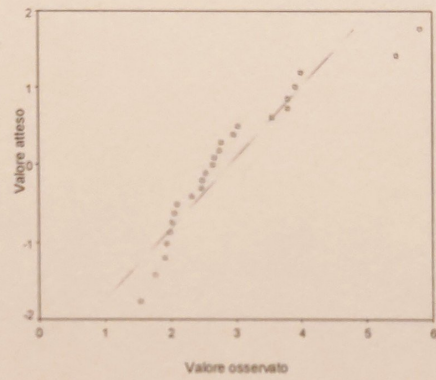


Grafico 5.21 e 5.22: Grafici di distribuzione delle α_2 globuline nel camoscio.

Grafico 5.21

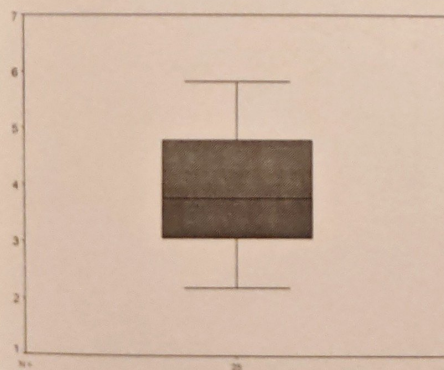


Grafico 5.22

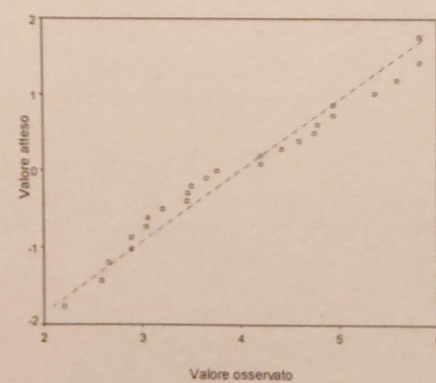


Grafico 5.23 e 5.24: Grafici di distribuzione delle β_1 globuline nel camoscio.

Grafico 5.23

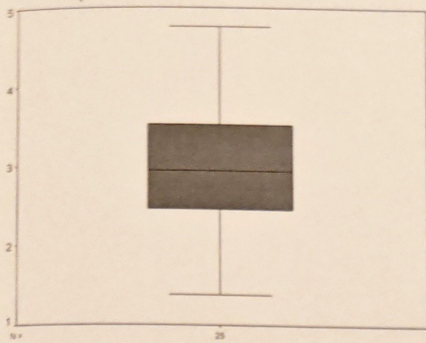


Grafico 5.24

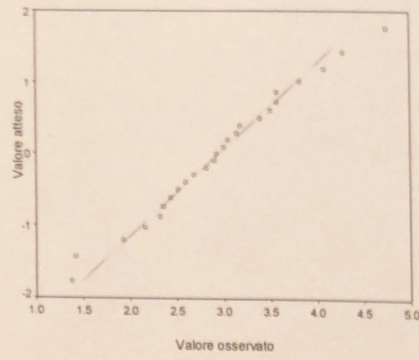


Grafico 5.25 e 5.26: Grafici di distribuzione delle β_2 globuline nel camoscio.

Grafico 5.25

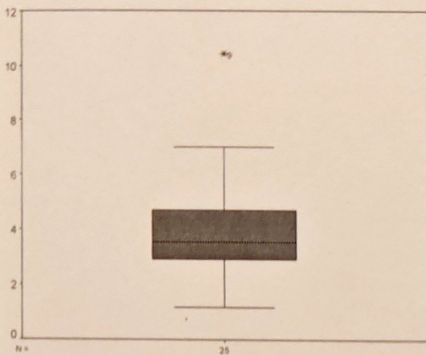


Grafico 5.26

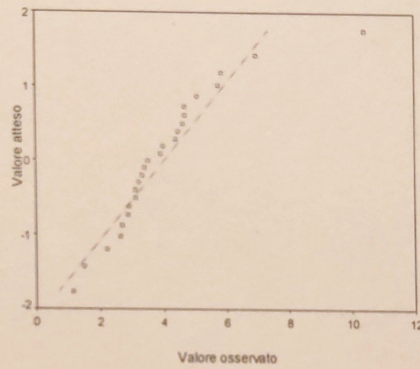


Grafico 5.27 e 5.28: Grafici di distribuzione delle γ globuline nel camoscio.

Grafico 5.27

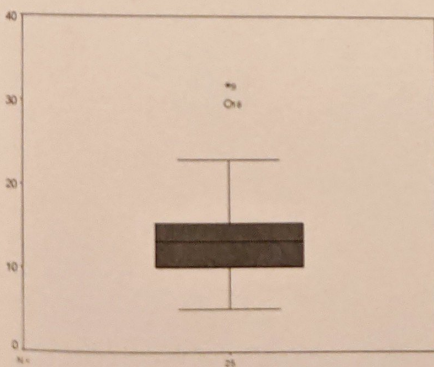
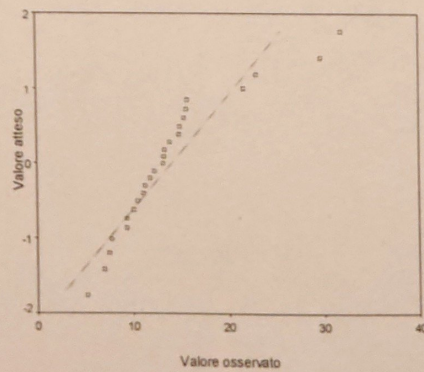


Grafico 5.28



Proteine di fase acuta

Nelle tabelle 5.3 e 5.4 vengono riportati i dati risultanti dall'analisi statistica eseguita per i valori di proteine di fase acuta ottenuti tramite le prove di laboratorio descritte nei capitoli precedenti.

Nei grafici viene mostrata la distribuzione della popolazione rispetto ad ogni parametro preso in considerazione.

Tali distribuzioni, sia per il cinghiale che per il camoscio, risultano, nella maggior parte dei casi, anormali. Solo l'aptoglobina del cinghiale risponde ai parametri di normalità. Tutti i risultati riguardanti le altre proteine di fase acuta sono stati analizzati con prove statistiche non parametriche.

Nel cinghiale (tab.5.3) non si è evidenziata nessuna differenza significativa fra il gruppo di animali sani e quello di animali affetti da tubercolosi per nessuna delle proteine di fase acuta considerate.

In quanto al camoscio (tab.5.4) la differenza è significativa per entrambe le proteine di fase acuta prese in esame.

Tabella 5.3: Valori di proteine di fase acuta: Aptoglobina, Sieroamiloide A, proteina C reattiva e Pig-MAP ottenuti da sieri di cinghiali sani e cinghiali affetti da tubercolosi.

Parametri	Cinghiali sani (n=16)			Cinghiali infetti (n=9)			Sign.
	Media	DS	Range	Media	DS	Range	
Aptoglobina (g/l)	0.79	0.97	0.27-1.30	0.60	0.44	0.27-0.94	N.S.
Sieroamiloide A (g/l)	40.13	96.13	-11.1-91.36	1.40	1.96	0-2.91	N.S.
Proteina C reattiva (µg/dl)	56.58	61.47	23,83-89.34	45.60	6.25	0-93.63	N.S.
Pig-MAP (g/l)	2.41	1.03	1.86-2.96	1.44	0.68	0.91-1.97	N.S.

n= numero di animali presi in esame; DS= deviazione standard; Sig=significatività.

N.S.=valore non significativo; *=valore significativo con $p<0.005$.

Grafico 5.29 e 5.30:Grafici di distribuzione dell'aptoglobina nel cinghiale.

Grafico 5.29

Grafico 5.30

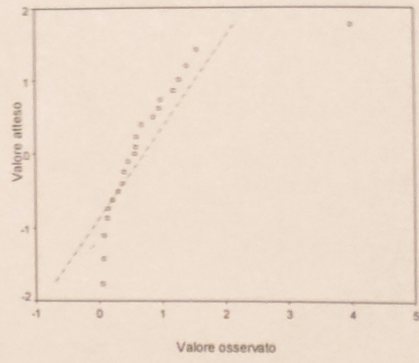
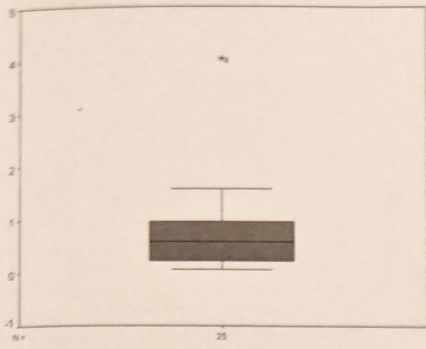


Grafico 5.31 e 5.32: Grafici di distribuzione dell'sieroamiloide A nel cinghiale.

Grafico 5.31

Grafico 5.32

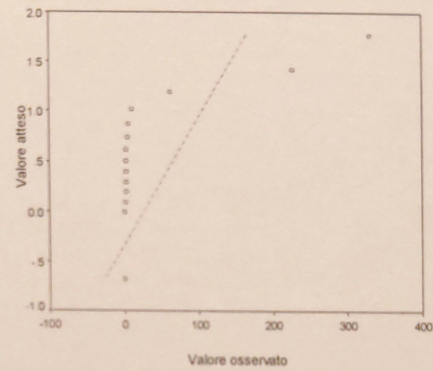
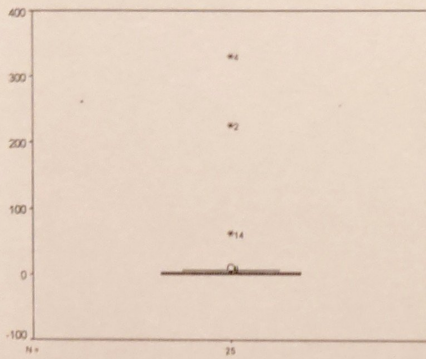


Grafico 5.33 e 5.34: Grafici di distribuzione della proteina C reattiva nel cinghiale.

Grafico 5.33

Grafico 5.34

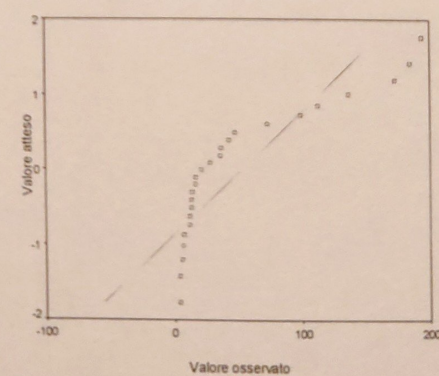
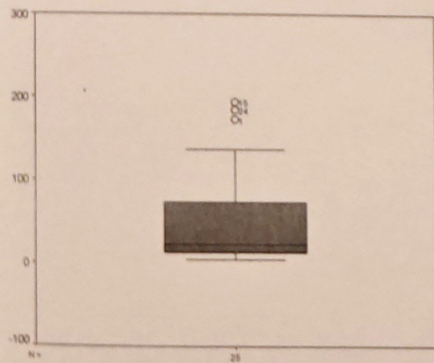


Grafico 5.35 e 5.36: Grafici di distribuzione della Pig-MAP nel cinghiale.

Grafico 5.35

Grafico 5.36

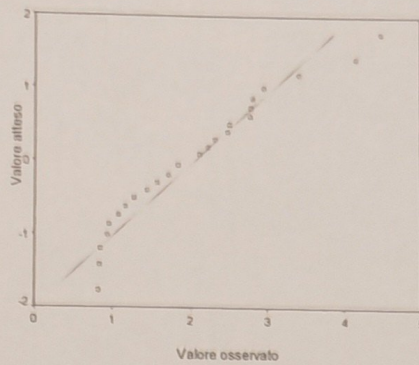
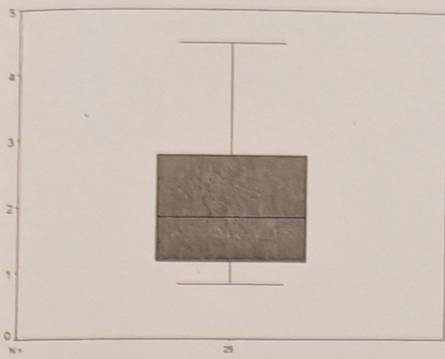


Tabella 5.4: Valori di proteine di fase acuta: Aptoglobina e AmiloideAserico, ottenuti da sieri di camosci sani e camosci affetti da pestivirus.

Parametri	Camosci sani (n=17)			Camosci infetti (n=8)			Sign.
	Media	DS	Range	Media	DS	Range	
Aptoglobina (g/l)	0.22	0.02	0.137-0.310	0.70	1.31	0-1.792	*
Sieroamiloide A (g/l)	2.20	0.48	1.211-3.184	138.94 (1)	13.10 (1)	97.26-180.63 (1)	*

n= numero di animali presi in esame; DS= deviazione standard; Sig=significatività.

N.S.=valore non significativo; *=valore significativo con $p < 0.005$.

(1)= Soltanto quattro degli otto soggetti affetti da pestivirus sono stati utilizzati per il calcolo statistico.

Grafico 5.37 e 5.38: Grafici di distribuzione dell'aptoglobina nel camoscio.

Grafico 5.37

Grafico 5.38

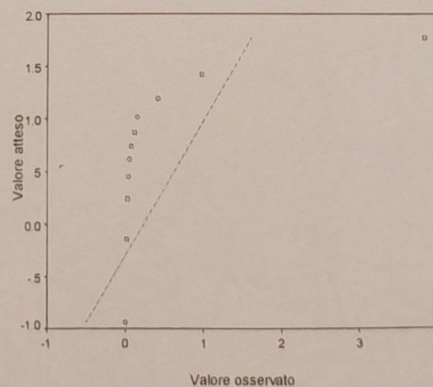
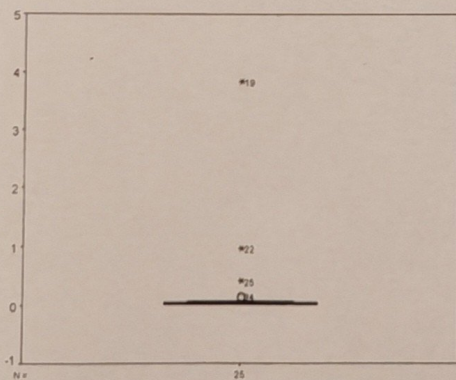


Grafico 5.39 e 5.40: Grafici di distribuzione dell' sieroamiloide A nel camoscio.

Grafico 5.39

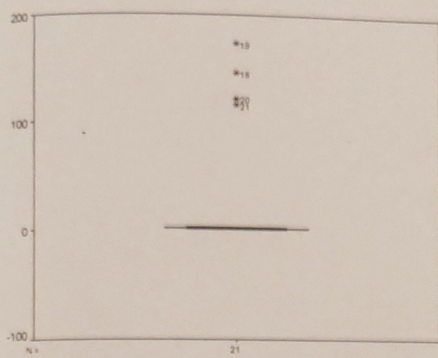
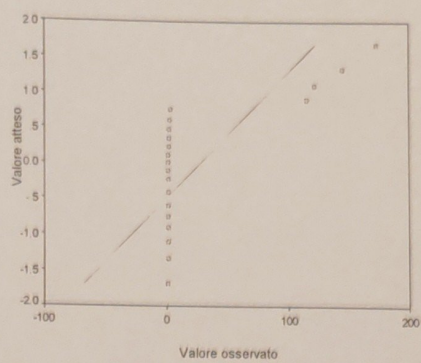


Grafico 5.40



6. DISCUSSIONE

Valori delle proteine plasmatiche totali e delle frazioni elettroforetiche nel cinghiale

Secondo i risultati ottenuti dall'analisi statistica, nel cinghiale non si riscontrano alterazioni del livello di proteina plasmatica totale, né tanto meno nelle diverse frazioni elettroforetiche, così significative da rivelare differenze tra il gruppo di animali sani e quello di animali affetti da tubercolosi.

La mancanza di tale alterazione può essere ricondotta al grado d'espansione dell'infezione e delle relative lesioni. Infatti, in tutti e nove i soggetti infetti presi in analisi, l'infezione era localizzata ai gangli mandibolari e non si era ancora verificata una generalizzazione. Ciò può essere spiegato da due differenti fenomeni:

- il batterio non ha avuto il tempo necessario per passare le barriere difensive e raggiungere il torrente ematico;
- l'animale stesso presentava una resistenza immunitaria tale da circoscrivere l'infezione e isolare i tubercoli.

In qualunque caso l'infezione tende a rimanere circoscritta, i danni prodotti vengono riparati all'interno del tubercolo primario senza alcuna necessità di causare una risposta di fase acuta generalizzata o comunque abbastanza potente da causare un innalzamento significativo dei parametri proteici.

Tale tesi viene ulteriormente confermata dall'assenza di differenze significative nelle concentrazioni delle γ globuline. Infatti, sebbene il gruppo di animali infetti presenti una concentrazione più elevata rispetto a quello dei sani, tale differenza non è sufficiente per giustificare una significatività rilevante.

Valori delle proteine plasmatiche totali e delle frazioni elettroforetiche nel camoscio.

Secondo i risultati ottenuti dall'analisi statistica, nel camoscio si riscontra una differenza significativa tra il gruppo di animali sani e quello di animali infetti per quanto riguarda la concentrazione di globulina α_{1b} . Al gruppo delle α globuline appartengono entrambe le proteine di fase acuta prese in esame per tale specie. Un'aumento di tale frazione elettroforetica evidenzia

come si sia verificata un'effettiva alterazione delle concentrazioni in seguito ad una risposta di fase acuta, nel nostro caso stimolata da un'infezione virale.

Altra differenza degna di nota è quella esistente fra la frazione γ globulinica dei diversi gruppi. A differenza di quanto dovrebbe succedere in condizioni normali, il gruppo dei soggetti sani presenta una concentrazione più elevata rispetto a quello dei soggetti infetti. Tale fenomeno viene spiegato con la natura immunosoppressiva del pestivirus. Nell'envelope del pestivirus è infatti presente una glicoproteina, denominata Erns, ad azione RNAsica che sottende a differenti funzioni biologiche, tra le quali quella immunosoppressiva (Brusche *et al.*, 1997).

Proteine di fase acuta nel cinghiale.

Secondo i risultati ottenuti dall'analisi statistica, nel cinghiale non si riscontrano alterazioni del livello di proteine di fase acuta (aptoglobina, sieroamiloide A, proteina C reattiva e Pig-MAP) così significative da rivelare differenze tra il gruppo di animali sani e quello di animali affetti da tubercolosi.

Come precedentemente detto per proteine plasmatiche totali e frazioni elettroforetiche, la causa può essere ricondotta al livello circoscritto e non ancora generalizzato dell'infezione.

Inoltre la popolazione ha presentato un andamento anormale ed irregolare. All'interno dei due gruppi esistono diversi soggetti outlayers con valori elevatissimi, maggiori della soglia di normalità, tipici di organismi in piena risposta di fase acuta. Se la tubercolosi in fase cronica non ha causato aumenti rilevanti nelle proteine di fase acuta, questi valori inducono a pensare che tali soggetti siano affetti da altre infermità, di probabile andamento acuto. Non è comunque possibile dimostrare tale fatto in quanto non sono state svolte analisi sierologiche specifiche oltre a quelle per la tubercolosi.

Proteine di fase acuta nel camoscio.

L'analisi statistica condotta per le proteine di fase acuta nel camoscio dimostra che, in questa specie, le differenze tra animali sani e animali affetti da pestivirus sono rilevanti e presentano una significanza piuttosto importante.

In entrambi i casi, sia per l'aptoglobina che per il sieroamiloide A, le popolazioni si sono dimostrate non normali e sono state eseguite prove non parametriche.

Per quanto riguarda l'aptoglobina, i cui valori basali generalmente tendono ad essere impercettibili nei ruminanti, si nota un notevole aumento in quasi tutti i soggetti affetti da infezione virale. Esistono infatti alcuni outliers che presentano valori prossimi alla media dei soggetti sani. Questi valori sono propri di soggetti che non erano ancora entrati in piena risposta di fase acuta o che ormai l'avevano superata con esito favorevole. Al fine di valutare l'effettiva influenza di tali outliers tutte le prove statistiche sono state ripetute eliminando i valori troppo bassi. Si è notato che tali valori non influenzavano il risultato in quanto la significatività manteneva valori di rilevanza e si è dunque deciso di lasciare integro il gruppo senza togliere nessun soggetto.

Per quanto riguarda il sieroamiloide A sono state attuate alcune correzioni.

Il sieroamiloide A è una proteina di fase acuta che raggiunge il suo picco massimo nelle 24 ore successive all'inizio della risposta di fase acuta, rimane elevato per 4-6 giorni e necessita di 2-4 settimane per tornare ai suoi livelli normali.

Degli otto soggetti presi in esame quattro presentavano concentrazioni elevate pari a 40-60 volte i livelli registrati nei soggetti sani. Tali soggetti si trovavano sicuramente in piena risposta di fase acuta, in un periodo che si colloca tra le 24 ore e le 2 settimane che seguono l'infezione virale.

Un soggetto presentava un valore lievemente alterato, con un livello 6 volte maggiore di quello normale. È possibile che il soggetto avesse appena contratto la malattia o si trovasse in quello periodo che sta tra le 2 e le 4 settimane in cui il livello scende notevolmente.

Gli altri tre soggetti presentavano un livello prossimo alla media dei soggetti sani. Tali animali avevano di sicuro passato la fase acuta dell'infiammazione e pur risultando positivi all'analisi sierologica non presentavano nessuna alterazione rilevante a livello proteico. Questi soggetti outliers, infatti, sono gli stessi che presentano valori anomali anche nell'aptoglobina.

Questi ultimi quattro animali sono stati volutamente eliminati dall'analisi statistica in quanto avrebbero falsato erroneamente la media e nascosto risultati ritenuti importanti ai fini della ricerca.

7. CONCLUSIONI

In cinghiali affetti da tubercolosi non generalizzata, le cui lesioni si riducono a tubercoli primari circoscritti ed isolati, la risposta di fase acuta stimolata non è sufficientemente alta da indurre un'alterazione nella concentrazione delle proteine plasmatiche totali, delle frazioni elettroforetiche né delle differenti proteine di fase acuta.

E' comunque importante tenere in conto che, a causa della mancanza di dati sull'effettivo grado di sviluppo dell'infezione e di analisi sierologiche specifiche per malattie diverse dalla tubercolosi, non è possibile dimostrare che la conclusione sopra formulata sia certa.

Nel camoscio un'infezione virale, come quella sostenuta da pestivirus, produce un aumento significativo nella concentrazione della frazione proteica α_1 globulinica e una diminuzione della frazione γ globulinica, dovuta all'azione immunosupprimente del virus.

Per tale specie aptoglobina e sieroamiloide A possono essere considerate proteine di fase acuta primarie ed essere utilizzate per evidenziare la presenza di infezioni virali.

8. BIBLIOGRAFIA

- ALSENGEEST, S.P., LAMBOOG, I.E., WIERENGA, H.K., DIELEMAN, S.J., MEECKER, B., VAN EDEREN, A.M., NIEWOLD, T.A. (1995). Influence of physical stress on the plasma concentration of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (Hp) in calves. *Vet. Q.* 17: 9-12.
- AMOG, V.M., BULL, R.W., MICHEL, R.L. (1977). Comparison of electrophoretograms of Normal Canine Serum and Plasma and of Serum and Plasma of Hemolyzed Specimens. *Am. J. Vet. Res.* 38: 387-390.
- ANDERSON, H.C., Mc CARTY, M. (1951). The occurrence in the rabbit of an acute phase protein analogous to human C-reactive protein. *J. Exp. Med.* 93: 25-36.
- ARTHINGTON, J.D., GOHER, S.D., KUNKLE, W.E., MARTIN, F.G. (2003). Effect of transportation and commingling on the acute phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. *J. Anim. Sci.* 81: 1120-1125.
- BIA, M.J. e DEFRONZO, R.A. (1981). Extrarenal potassium homeostasis. *Am. J. Physiol.*, 240: 257-268.
- BRELURUT, A. (1991). Effets de la capture et du trasporte sur quelques constantes sanguines du jeune cerf (*Cervus elaphus*). *Gibier Faune Sauvage*, 8: 271-282.
- BROOM, D.M. e JOHNSON, K.G. (1993). *Stress and animal welfare*. Chapman and Hill: London.
- BRUSCHKE, C.J., HULST, M.M., MOORMANN, R.J., van RIJN, P.A., van OIRSCHOT, J.T. (1997). Glycoprotein Erns of pestivirus induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J. Virol. Sep.*, 71, n.9: 6692-6696.
- BRUSS, M.L. (1997). Lipids and chetones. In: *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5^a ed. Kaneko J.J., Harvey J.W. e Bruss M.L. Ediz: Academic Press Inc.: San Diego. Pp: 83-115.
- CANNON, W.B. (1935). Stresses and strains of homeostasis. *Am. J. Med. Sci.* 189: 1-14.

CARLSON, G.P. (1997). Fluid, electrolyte, and acid-base balance. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5^a ed. Kaneko J.J., Harvey J.W. e Bruss M.L. Ediz: Academic Press Inc.: San Diego. Pp: 485-516.

CASTRO, A., DHINDSA, D.S., HOVERSLAND, A.S. e METCALFE, J. (1977). Serum proteins and protein electrophoretic pattern in normal pigmy goats. *Am. J. Vet. Res.*, 38: 665-667.

CHAPEL, R.S., ENGLISH, A.W., MULLEY, R.C. e LEPHERD, E.E. (1991). Haematology and serum biochemistry of captive unsedated chital deer (*Axis axis*) in Australia. *J. Wildlife Dis.*, 27: 396-406.

CROSS, J.P., MACKINTOSH, C.G. e GRIFFIN, J.T.F. (1988). Effect of physical restraint and xylazine sedation on haematological values in red deer (*Cervus elaphus*). *Res. Vet. Sci.*, 45: 281-286.

DEAK, T., MERIWEHWE, J.L., FLESHNER, M., SPENCER, R.L., ABOUHAMZE, A., MOLDAWER, L.L., GRAHN, R.E., WATKINS, L.R., MAIER, S.F. (1997). Evidence that brief stress may induce acute phase response in rats. *Am. J. Phys.* 273, R1998-2004.

DEL GIUDICE, G.D., MECH, L.D. e SEAL, U.S. (1990). Effects of winter undernutrition on body composition and physiological profiles of white-tailed deer. *J. Wildlife Manage.*, 54: 539-550.

DE LIBERTO, T.J., PFISTER, J.A., DEMARAIS, S. e VAN VREEDE, G. (1989). Seasonal changes in physiological parameters of white-tailed deer in Oklahoma. *J. Wildlife Manage.*, 53: 533-539.

DI BARTOLA, S.P. (ed.). (1992). Disorders of sodium and water: hypernatremia and hyponatremia. In: *Fluid therapy in small animal practice*. Ediz: W.B. Saunders Company: Philadelphia. Pp: 57-88.

DUNN, A.J. e BERRIDGE, C.W. (1990). Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res. Rev.*, 15: 71-100

ECKERSALL, P.D. (2000). Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease *in animals*. *Review Med. Vet.*, 151, 7: 577-584.

ELSON, E.C. (1974). Quantitative determination of serum haptoglobulins simple and rapid method. *Am. J. Clin. Pathol.* 62: 655-663.

ESPMARK, Y. e LANGVATN, R. (1985). Development and habituation of cardiac and behavioural responses in young red deer calves exposed to alarm stimuli. *J. Mammal.*, 66: 702-711.

FERRIL, W. (2005). Inflammation and heart disease: a holistic perspective. In: *Townsend letter for doctors and patients*.

FRANMANN, A.W., FLYNN, A. e ARNESON, P.D. (1975). Serum corticoid levels relative to handling stress in Alaskan mouse. *Can. J. Zoolog.*, 53: 1424-1426.

GRABIELSEN, G.W., KANWISHER, J.W. e STEEN, J.B. (1977). Emotional bradycardia: a telemetry study on incubating willow grouse (*Lagopus lagopus*). *Acta Physiol. Scand.*, 100: 255-257.

HARGREAVES, A.L. e HUSTON, G.D. (1990). Changes in heart rate, plasma cortisol and haematocrit of sheep during a shearing procedure. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 26: 91-101.

HASTINGS, B.E., ABBOT, D.E. e GEORGE, L.M. (1992). Stress factors influencing plasma cortisol levels and adrenal weights in Chinese water deer (*Hydropotes inermis*). *Res. Vet. Sci.*, 53: 375-380.

HEINRICH, P.C., CASTELL, J.V., ANDUS, T. (1990). Interleukin-6 and acute phase response. *Biochem. J.* 265: 621-636.

:

HENRY, J.P. e STEPHENS, P.M. (1997). Stress, health, and the social environment: a sociobiologic approach to medicine. *Topics in environmental physiology and medicine*. Springer-Verlag, New York: 131-134.

HOFER, M.A. (1970). Cardiac and respiratory function during sudden prolonged immobility in wild rodents. *Psychosom. Med.*, 32: 633-647.

HYVÄRINEN, H., HELLE, T., NIEMEN, N., VÄYRYNEN, P. e VÄYRYNEN, R. (1976). Some effects of handling reindeer during gathering on the composition of their blood. *Anim. Prod.*, 22: 105-114.

JAIN, N.C. (1989). Acute phase protein. In: *Current Veterinary Therapy X: Small animal practise*. Ediz: Kirk R.W., W.B. Saunders, Philadelphia. Pp: 468-471.

KAGAN, A.R. e LEVI, L. (1974). Health and environment-psycho-social stimuli: a review. *Soc. Sci. Med.*, 8: 225-241.

KANEKO, J.J. (1997). *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5^a ed. Kaneko J.J., Harvey J.W. e Bruss M.L. Ediz: Academic Press Inc.: San Diego.

KANEKO, J.J. (1997a). Carbohydrate metabolism and their disease. In: *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5^a ed. Kaneko J.J., Harvey J.W. e Bruss M.L. Ediz: Academic Press Inc.: San Diego. Pp: 45-81.

KANEKO, J.J. (1997b). Serum proteins and dysproteinemias. In: *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5^a ed. Kaneko J.J., Harvey J.W. e Bruss M.L. Ediz: Academic Press Inc.: San Diego. Pp: 117-138.

KEAY, G. e DOXEY, D.L. (1984). Serum protein values from healthy ewes and lambs of various ages determined by agarose gel electrophoreses. *Br. Vet. J.*, 140: 85-88.

KENT, J.E., CHAPMAN, D.I. e CHAPMAN, N.G. (1980). Serum constituents of red deer (*Cervus elaphus*). *Res. Vet. Sci.*, 28: 55-57.

KOCAN, A.A., GLENN, B.L., THEDFORD, T.R., DOYLE, R., WALDRUP, K., KUBAT, G. e SHAW, M.G. (1981). Effects of chemical immobilization on hematologic and serum chemical values in captive white-tailed deer. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 179: 1153-1156.

KOCK, M.D., JESSUP, D.A., CLARK, R.C., FRANTI, C.E. e WEAVER, A. (1987). Effect of capture on biological parameters in free-ranging bighorn sheep (*Ovis Canadensis*): Evaluation of dropnet, drive-net, chemical immobilization and the net-gun. *J. Wildlife Dis.*, 23: 641-651.

LA RESCHE, R.E., SEAL, U.S., KARNS, P.D. e FRANZMANN, A.W. (1974). A review of blood chemistry of moose and other cervidae with emphasis on nutritional assessment. *Nat. Can.*, 101: 263-290.

LASTRAS, M.E., MARCO, I., MONTANÉ J. e LAVÍN, S. (1999). Immunoglobulin G levels and electrophoretic patterns in four species of Spanish ungulates. Proceeding of the 26th World Veterinary Congress of the World Veterinary Association. Settembre 1999, Lione (Francia).

MACKIEWICZ, A., GANAPATHI, M.K., SCHULTZ, D., SAMOLS, D., REESE, J., KUSHNER, I. (1988). Regulation of rabbit acute phase protein byosynthesis by monochines. *Biochem. J.* 253 (3): 851-857.

MAKIMURA, S. e SUZUKI, N. (1982). Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. *Jpn. J. Vet. Sci.* 44: 15-21.

MARCO, I. e LAVÍN S. (1999). Effect of the method of capture on the haematology and blood chemistry of red deer (*Cervus elaphus*). *Res. Vet. Sci.*, 66: 81-84.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S., TECLES, F., PARRA, M.D., CERÓN, J.J. (2001). Proteínas de fase aguda: conceptos basicos y principales aplicaciones clinicas en medicina veterinaria. *Anales de Veterinaria de Murcia*, vol. 17: 97-113.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S., BERNAL, L.J., CERON, J.J. (2003). Serum concentration of acute phase proteins in dog with leishmaniosis during short time treatment. *Am. J. Vet. Res.* 64(8): 1021-6.

MASON, J.W. (1968a). A review of psychoendocrine research on the pituary-adrenal cortical system. *Psychosom. Med.*, 30: 576-607.

MASON, J.W. (1968b). A review of psychoendocrine research on the sympathetic adrenal medullary system. *Psychosom. Med.*, 30: 631-653.

MOBERG, G.P. (1987). Problems in defining stress and distress in animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 191: 1207-1211.

MORTON, D.J., ANDERSON, E., FOGGIN, C.M., KOCK, M.D. e TIRAN, E.P. (1995). Plasma cortisol as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. *Vet. Rec.*, 136: 60-63.

MURATA, H., SHIMADA, N., YOSHIOKA, M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal* 168: 28-40.

NUKINA, H., SUDO, N., AIBA, Y., OYAMA, N., KOGA, Y., KUBO, C. (2001). restrain stress elevates the plasma interleukin-6 levels in germ-free mice. *J. Neuroimmunology* 115: 46-52.

OSBALDISTON, G.W. (1972). Serum protein fractions in domestic animals. *Br. Vet. J.*, 128: 386-393.

PALTRINIERI, S. (2005). Le proteine di fase acuta come strumento diagnostico in animali da reddito e da compagnia. *Praxis Vet.*, 26: 2-8.

PEINADO, V.I., FERNANDEZ-ARIAS, A., VISCOR, G. e PALMEQUE, J. (1993). Haematology of Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) restrained by physical or chemical mens. *Vet. Rec.*, 132: 580-583.

PETERSON, H.H., NIELSEN, J.P., HEEGAARD, P.M.H. (2004). Application of acute phase protein measurement in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 35: 163-187.

PROWSE, K.R. e BAUMANN, H. (1989). Interleukin-1 and Interleukin-6 stimulate acute phase protein production in primary mouse hepatocytes. *J. Leukocyte Biol.* 45: 55-61.

REID, T.C. e TOWERS, N.R. (1985). Blood parameters of normal farmed deer. *Biol. Deer Prod.*, 22: 73-76.

SANHOURI, A.A., JONES, R.S. e DOBSON, H. (1992). Effects of xylacine on the stress response to transport in male goats. *Brit. Vet. J.*, 48: 119-128.

SEAL, U.S. e HOSKINSON, R.L. (1978). Metabolic indicators of habitat condition and capture stress in proghorns. *J. Wildlife Manage*, 42: 753-757.

SEALANDER, J.A., GIPSON, P.S., CARTWRIGHT, M.E. e PLEDGER, J.M. (1975). Behavioral and physiological studies of relationships between white-tailed deer and dogs in Arkansas. Final report to Arkansas Game and Fish Commission. Department of zoology, University of Arkansas: Fayetteville.

SEGALÈS, J., VICENTE, J., LUJÁN, L., TOUSSAINT, M.J.M., GRUYS, E., GORTÁZAR, C. (2005). Systemic AA-amyloidosis in a European wild boar (*Sus scrofa*) suffering from generalized tuberculosis. *J. Vet. Med. A* 52: 135-137.

SELYE, H. (1946). The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J. Clin. Endocrinology*, 6: 117-196.

SPODICK, D.H. (1980). Physiologic and prognostic implications of invasive monitoring. *Am. J. Cardiol.*, 46: 173-175.

SRAKER, T.R. (1982). An overview of the pathophysiology of capture myopathy and related conditions that occur at the time of capture of wild animal. In: *Chemical immobilization of north American wildlife*. Nielsen L., Haigh J.C. e Fowler M.E. Ediz: Wisconsin Humane Society: Milwaukee. Pp: 83-118.

THOMAS, J.S. (2000). *Overview of Plasma Proteins*. In: *Shalm's Veterinary Haematology*. Feldman B.F. et al. Ediz: Philadelphia: Lippincott. Cap. 134. Pp: 891-898.

THURLEY, D.C. e MCNATTY, K.P. (19873). Factors affecting peripheral cortisol levels in unrestricted ewes. *Acta Endocrinol-Cop*, 74: 331-337.

TSIOURISS, J.A., CHAUHAN, V.P.S., SHEIKIN, A., CHAUHAN, A., MALIK, M., VAUGHAN, M.R. (2004). Similarities in acute phase proteins response during hibernation in black bears and major depression in human: a response to underlying metabolic depression? *Can. J. zool/ Rev. can. Zool.* 82(9): 1468-1476.

URSACHE, O., CHEVRIER, L., BLANCOU, J.M. e JAQUEN, M. (1980). Valuer des paramètres biochimiques et hématologiques chez le chevreuil (*Capreolus capreolus*). *Revue Méd. Vét.*, 131:547-552.

VIÑAS, L., LAVÍN, S., CALLIS, M. e ESPADA, Y. (1989). Estudio de los parámetros sanguíneos en cabras tras su transporte y posterior adaptación. I-V. Hematocrito, glucosa, colesterol, urea, creatinina, cortisol e iones. *Med. Vet.*, 6: 536-540.

WESSON, J.A., SCALON, P.F., KIRPATRICK, R.L. e MOSBY, H.S. (1979). Influence of chemical immobilization and physical restrain on packed cell volume, total protein, glucose, and blood urea nitrogen on blood of white-tailed deer. *Can. J. Zoolog.*, 57: 756-767.

WICHER, J.T. e WESTACOTT, C.I. (1992). The acute phase response. In: *Biochemistry of Inflammation*. Ediz: Wicher J.T. e Evans, S.W. Kluwer Academic Londres. Pp: 243-271.

WILSON, P.R. e PAULI J.V. (1982). Blood constituents of farmed red deer (*Cervus elaphus*). I. Haematological values. *N. Z. Vet. J.*, 30: 174-176.

WOLKERS, H., WENSING, T. e SCHONEWILLE, J.T. (1994). Effect of undernutrition on haematological and serum biochemical characteristics in red deer (*Cervus elaphus*). *Can. J. Zoolog.*, 72: 1291-1296