

**STUDIO SULL'ATTIVITA' IMMUNOSTIMOLANTE
INDOTTA DA POLISACCARIDI DI ORIGINE VEGETALE NEL BOVINO**

Tezzele R.* , Taddei S.** , Martelli P.*** e Cavirani S.**

* Veterinario libero professionista;

** Istituto di Malattie Infettive, Profilassi e Polizia Veterinaria, Università di Parma;

*** Istituto di Clinica Medica, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma.

Riassunto

L'attività immunostimolante nel bovino evocata da una miscela di polisaccaridi di origine vegetale somministrata per via orale con la dieta per 20 giorni consecutivi è stata valutata *in vitro* attraverso lo studio di risposta anticorpale specifica dopo somministrazione di vaccino inattivato e vivo-attenuato verso BHV-1, conta leucocitaria, sieroproteine, immunoglobuline sieriche e blastizzazione linfocitaria dopo stimolazione aspecifica.

I dati di laboratorio indicano una attività immunostimolante indotta dal prodotto circoscritta alla componente cellulo-mediata così come espressa dalla valutazione comparativa dell'indice di sensibilità linfocitaria dopo stimolazione con concanavalina A degli animali sottoposti a trattamento rispetto a quelli non.

Summary

Immunostimulating activity in dairy heifers elicited by plant polisaccarides orally administered for 20 days was studied *in vitro* by assessing antibody response after vaccination with inactivated or live-attenuated vaccines, leukocytes counting, serum proteins, serum immunoglobulins and blast transformation of peripheral blood lymphocytes.

Results pointed out that the treatment elicited cell-mediated immunostimulation as demonstrated comparing the index of stimulation in Concanavalin A-stimulated lymphocytes detected in treated and non-treated cattle.

Introduzione

Nell'ambito dell'allevamento intensivo del bovino, sia esso da latte che da carne, numerosi sono gli eventi che inducono stati depressivi del sistema immunitario. Numerosi sono i microrganismi che vengono invocati nel determinismo di patologia, in particolare respiratoria ed enterica, nel bovino. Tuttavia solo pochi rispondono fedelmente ai noti Postulati di Koch. In effetti la gran parte dei patogeni manifesta a pieno la loro potenzialità al verificarsi di fattori predisponenti che inducono a ritenere le patologie osservate nell'allevamento intensivo come condizionate-polifattoriali. Gravi stati patologici conseguono al verificarsi di fattori stessanti (trasporto, affollamento, conflittualità innescata da perturbative dell'equilibrio gerarchico nel gruppo, bruschi cambi di dieta) e microclima (6, 7). In rapporto all'animale detti fattori possono essere altresì indicati come endogeni o esogeni. Al verificarsi di detti eventi, peraltro di difficile elusione nel corso dei vari cicli produttivi, si verifica un'azione sinergica tra fattori extramicrobici e microbici che esita nella comparsa di patologia clinicamente manifesta la cui gravità dipende, ancora una volta, dal complesso polifattoriale. Detta azione sinergica trova espressione nella compromissione delle resistenze organiche

attraverso la depressione delle funzionalità immunitarie umorale e cellulo-mediata (2, 11).

Numerose malattie trovano nella vaccinazione la razionale risposta volta a contenere l'azione di patogeni specifici. Tuttavia l'intervento vaccinale trova il suo limite nell'azione circoscritta alla valenza prevista dal presidio immunizzante, alla possibile interferenza da parte di anticorpi passivi, di origine materna nonché al verificarsi di stati immunodepressivi evocati dai fattori di cui in precedenza.

In considerazione di ciò assume crescente interesse l'impiego di presidi ad attività immunostimolante o immunomodulatrice, da utilizzare durante fasi critiche del ciclo produttivo. L'intervento farmacologico volto alla stimolazione del complesso cellulare che reagisce non specificamente nella "prima linea" di difesa prende il nome di paraimmunizzazione (3). Le sostanze capaci di evocare immunomodulazione o paraimmunità sono state di concerto definite come immunomodulatori o induttori di paraimmunità.

Per quanto attiene alla classificazione di detti presidi, questa, più che dal sito di azione, viene piuttosto informata dalla relativa origine. Si parla pertanto di immunomodulatori biologici (batteri e loro prodotti, estratti di lieviti, virus, parapox in particolare, prodotti fisiologici regolatori) e chimici (levamisolo, isoprinosina, avridina, azimexone, poliribonucleotidi sintetici) (9). Nel contesto degli immunomodulatori biologici trovano collocazione sostanze di origine vegetale, e in particolare polisaccaridi da piante diverse.

Scopo del presente studio è di valutare l'attività immunostimolante nella specie bovina di un prodotto a base di frazioni polisaccaridiche di origine vegetale.

Materiali e metodi.

Disegno dell'esperimento

La sostanza oggetto di studio è costituita da un prodotto commerciale a base di polisaccaridi ottenuti da erbe appartenenti specie diverse (*Echinacea purpurea*, *E. angustifolia* e *E. pallida*) della famiglia *Astraceae*, miscelate in parti uguali. Il trattamento ha previsto la somministrazione del prodotto alla dose di 100 grammi capo/giorno per 20 giorni.

Nel complesso sono state considerate n. 60 bovine di razza frisona, appartenenti allo stesso allevamento, di età compresa 12 e 18 mesi, non sottoposte a profilassi immunizzante per BHV-1.

Durante il periodo di osservazione non sono stati eseguiti interventi immunizzanti specifici o aspecifici oltre a quanto di seguito indicato.

Gli animali sono stati ripartiti secondo il seguente protocollo d'intervento:

Gruppo A: 10 animali, non trattati, somministrato vaccino inattivato monovalente BHV-1;

Gruppo B: 10 animali, non trattati, somministrato vaccino vivo-attenuato monovalente BHV-1;

Gruppo C: 10 animali, non trattati, non vaccinati;

Gruppo D: 10 animali, trattati, somministrato vaccino inattivato monovalente BHV-1;

Gruppo E: 10 animali, trattati, somministrato vaccino vivo-attenuato monovalente BHV-1;

Gruppo F: 10 animali, trattati, non vaccinati.

L'intervento vaccinale è stato eseguito in ogni caso entro 10 giorni dal termine del trattamento oggetto di studio.

Si è pertanto proceduto alla valutazione individuale del titolo anticorpale sierico nei confronti di BHV-1,

Su siero, sangue *in toto* e frazione cellulare ematica prelevati entro 10 giorni dal termine del trattamento (o al momento della vaccinazione) (1° prelievo) e dopo 20 giorni (2° prelievo) sono stati rilevati:

- titolo anticorpale nei confronti di BHV-1, mediante sieroneutralizzazione (SN) (5);
- conta leucociti (cellule/ml x 10³), mediante apparecchio automatico (*Medonic*);
- sieroproteine totali (g/100 ml) (8);
- gamma globuline sieriche (mg/ml), calcolate in relazione alla percentuale delle frazione espressa a seguito di migrazione elettroforetica del siero su acetato di cellulosa e lettura densitometrica delle bande proteiche;
- stimolazione linfocitaria mediante saggio di incorporazione di 3H-timidina dopo stimolazione con Concanavalina A e valutazione dell'indice di stimolazione (IS: rapporto, espresso in c.p.m., tra il valore medio di incorporazione di 3H-TdR delle cellule stimolate e quello delle cellule non stimolate) (10).

Per ogni determinazione considerata è stata calcolata la media aritmetica e la deviazione standard all'interno dei singoli gruppi indicati. Inoltre si è proceduto al confronto delle medie dei singoli gruppi mediante calcolo del *t di Student*.

Risultati

La somministrazione del prodotto indicato non ha comportato insorgenza di modificazioni rilevabili clinicamente nei soggetti sottoposti al trattamento. Parimenti, stato generale e grandi funzione organiche degli stessi non hanno subito modificazioni significative.

I risultati inerenti alle indagini di laboratorio volte alla determinazione dei parametri immunitari siero-ematici di cui in precedenza sono indicati in tabella 1.

Tabella 1. Distribuzione dei parametri immunitari siero-ematici (media aritmetica ± deviazione standard) nei diversi gruppi di bovini.

Gruppo	Prelievo	Titolo SN BHV-1	Leucociti	Sieroprot. totali	Gamma Globuline	Indice sens. linfocitaria
A	1°	0,8±1,1	8940±1850	6,8±0,7	23,8±3,5	12162±1722
	2°	10,4±5,4	9741±768	6,5±1,2	25,1±5,2	11120±2140
B	1°	1,0±1,1	8140±751	7,1±1,8	24,2±8,3	11910±2411
	2°	9,0±5,1	8450±831	6,9±2,4	25,1±6,2	12022±4120
C	1°	1,2±1,4	9430±1830	6,8±3,1	22,9±4,3	11908±4110
	2°	1,4±1,6	9650±2110	7,4±3,2	21,9±3,6	12022±3115
D	1°	1,0±1,4	9120±1750	6,4±1,2	24,2±6,2	14995±2284
	2°	8,0±4,6	8980±2420	6,9±1,2	23,8±3,2	15022±3140
E	1°	0,9±0,5	8510±2420	7,2±2,2	25,1±6,2	15611±3140
	2°	8,4±3,5	9118±2511	6,7±1,9	24,8±5,2	12221±2120
F	1°	0,8±1,1	8740±1150	6,9±2,3	23,6±3,2	15882±1210
	2°	0,8±0,8	9005±2415	6,7±1,7	24,8±5,6	12034±1898

Per quanto attiene alla valutazione statistica, mediante calcolo *del t di Student*, e volta alla comparazione dei dati ottenuti nei diversi gruppi di animali, sono risultati statisticamente significativi ($P < 0,01$) i raffronti tra i seguenti gruppi (di seguito vengono riportati solo i raffronti ritenuti utili alla interpretazione dei risultati ottenuti):

Titolo SN verso BHV-1:

A1° vs A2°, B1° vs B2°, D1° vs D2°, E1° vs E2°,
A2° vs C2°, B2° vs C2°, D2° vs F2°, E2° vs F2°;

Indice di stimolazione linfocitaria:

D1° vs A1°, D1° vs B1°, D1° vs C1°,
E1° vs A1°, E1° vs B1°, E1° vs C1°, E1° vs E2°,
D2° vs A2°, D2° vs B2°, D2° vs C2°, D2° vs E2°, D2° vs F2°,
F1° vs A1°, F1° vs B1°, F1° vs C1°.

Discussione e conclusioni

Al fine di addivenire ad una corretta valutazione critica dei risultati ottenuti si ritiene opportuno premettere alcune considerazioni. Facciamo specifico riferimento al fatto che il trattamento oggetto di studio ha interessato bovini che non presentavano stati clinici riportabili ad immunocompromissione. Ne consegue che eventuali benefici derivanti dal trattamento di animali immunocompromessi non possano trovare riscontro oggettivo nello studio eseguito. Al riguardo, in questa sede ci preme rimarcare come stati di immunodepressione siano, con frequenza crescente, invocati nell'ambito di manifestazioni patologiche osservate nell'allevamento intensivo del bovino, sia da latte e da carne. Detti stati trovano la loro genesi in componenti di natura infettiva, ma anche manageriale. Tuttavia, va parimenti osservato come l'evidenza diagnostica degli stessi non possa basarsi su elementi di carattere clinico ma debba trovare oggettivo riscontro strumentale attraverso opportuni accertamenti di laboratorio atti a valutare parametri inerenti al complesso delle funzioni immunitarie del singolo e successiva proiezione nell'ambito di allevamento.

Detto ciò, la valutazione statistica dei dati da noi acquisiti starebbe ad indicare una attività immunostimolante aspecifica del trattamento in parola rivolta in particolare verso l'immunità cellulo-mediata. In effetti, i risultati relativi agli indici di sensibilità linfocitaria dopo stimolazione aspecifica indicano una differenza significativa nei gruppi sottoposti al trattamento rispetto a quelli non trattati. Detto effetto sembra, tuttavia, esaurirsi nell'arco di 20 giorni dal termine del trattamento stesso.

Al contrario, non sono state rilevate modificazioni di rilievo riportabili al trattamento nei riguardo degli altri parametri considerati, in particolare quelli inerenti ai titoli sierologici medi ottenuti dopo vaccinazione con presidi inattivato e vivo attenuato verso BHV-1.

A questo proposito, è tuttavia da osservare come, nel corso del 2° prelievo (eseguito dopo 20 giorni dal termine del trattamento), gli animali sottoposti a trattamento-vaccinazione con presidio inattivato (gruppo D2°) mantengano un indice di sensibilità linfocitaria medio superiore rispetto agli animali non trattati (gruppi A2°, B2° e C2°) ma anche a quelli trattati-vaccinati con presidio vivo-attenuato (gruppo E2°) ed a quelli trattati non vaccinati (gruppo F2°).

A giustificazione di quanto precede potrebbe essere invocata l'attività immunostimolante aspecifica riconducibile alla componente adjuvante presente nel solo vaccino inattivato. Detta azione sarebbe evocativa di una sorta di rafforzamento della

immunità cellulo-mediata aspecifica indotta dal trattamento, che in assenza di vaccinazione tenderebbe ad esaurirsi.

A conclusione si ritiene che, come già indicato in letteratura (1, 4), l'intervento con prodotti dotati di attività immunostimolante possa rappresentare un possibile sostegno farmacologico atto a contrastare l'insorgenza di stati patologici, in particolare attraverso la stimolazione della prima linea di difesa organica verso gli aggressori microbici. Ciò non deve comunque essere ritenuto strumento succedaneo ma coadiuvante dell'impiego di interventi immunizzanti specifici.

In questo senso l'utilizzo di presidi di origine vegetale, dotati di elevata biocompatibilità e possibilità di somministrazione orale con la dieta, richiede adeguata attenzione. Al riguardo, riteniamo comunque indispensabile procedere alla validazione preliminare dei diversi prodotti e dei relativi protocolli di intervento attraverso un corretto supporto sperimentale.

Bibliografia

- 1) Berneri C., Amadori M., Ceccarelli A., Guadagnini P.F., Bolzani E. (1991). Comparative evaluation of specific vaccines and immuno-modulators in disease control of beef cattle. *J. Vet. Med. B*, 38: 60-77.
- 2) Blecha F., Minocha H.C. (1983). Suppressed lymphocyte blastogenic responses and enhanced *in vitro* growth of infectious bovine rhinotracheitis virus in stressed feeder calves. *Am. J. Vet. Res.*, 44: pp. 2145-2148.
- 3) Buttner M., Mayr A. (1986). Test on protection against viral diseases. *Comp. Immun. Microbil. infect. Dis.*, 9: pp. 205-210.
- 4) Castrucci G., Ferrari M., Osburn B.I., Frigeri F., Barreca F., Tagliati S., Cuteri V. (1995). The use of a non specific defence mechanism inducer in calves exposed to bovine herpesvirus-1 infection: preliminary trials. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 18: 85-91.
- 5) Cavarani S., Valla G., Flammini C.F., Scatozza F. (1986). Effetto dell'inoculazione per via vaginale in manze vergini di una mutante termosensibile del virus IBR. *Arch. Vet. Ital.*, 37: 143-151.
- 6) Martin S.W., Shwabe C.W., Franti C.E. (1975). Dairy calf mortality rate: influence of meteorological factors on calf mortality rate in Tulare country, California. *Am. J. Vet. Res.*, 36: pp. 1105-1109.
- 7) Martin S.W., Shwabe C.W., Franti C.E. (1975). Dairy calf mortality rate: influence of management and housing factors on calf mortality rate in Tulare country, California. *Am. J. Vet. Res.*, 36: pp. 111-1114.
- 8) Mayr A., Bachman P.A., Bibrack B., Wittman G. (1977). In: *Virologische Arbeitsmethoden. Band II*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 158-159.
- 9) Poli G. (1996). In: *Microbiologia e Immunologia Veterinaria*. Ed. UTET, pp. 780-788.
- 10) Roth J.A., Kaeberle M.L. Hsu W.H. (1982). Effects of ACTH administration on bovine polymorphonuclear leukocyte function and lymphocyte blastogenesis. *Am. J. Vet. Res.*, 43: 412-416.
- 11) Slocombe R.F., Derksen F.J., Babiuk L., Robinson N.E. (1987). A comparison of structural and functional derangements of calf lungs exposed to *Pasteurella Haemolytica* or *Pasteurella Haemolytica*-derived cytotoxin. *Proc. 14th World Congress on Diseases of Cattle*, Dublin, Ireland, 26-29 August 1986, pp. 573-578.