

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

Dipartimento Clinico Veterinario

Sezione di Medicina Interna

Direttore: Chiar.mo Prof. Paolo Famigli Bergamini

Dottorato di Ricerca in

Diagnostica Collaterale in Medicina Interna Veterinaria

VET/08 – Clinica Medica Veterinaria

QUADRI CLINICI IN SITUAZIONI DI:

ACIDOSI METABOLICA,

IPER L-LATTACIDEMIA E

IPER D-LATTACIDEMIA

SPERIMENTALMENTE INDOTTE

NEL VITELLO LATTANTE

Tesi di Dottorato di:

Dr. Sarah SCONZA

Relatore:

Chiar.mo Prof. Arcangelo GENTILE

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Paolo FAMIGLI BERGAMINI

XIX ciclo - AA. AA. 2003 - 2006

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 4
---------------------	--------

SEZIONE A: APPROFONDIMENTO BIBLIOGRAFICO

1. ACIDOSI LATTICA	pag. 8
1.1 Definizione di acidosi D-lattica	pag. 8
1.2 Metabolismo del DL- lattato nell'organismo	pag. 8
1.3 Manifestazioni cliniche dell'acidosi nei ruminanti e nell'uomo	pag. 19
1.3.1 Acidosi ruminale nel ruminante adulto	pag. 20
1.3.2 Acidosi ruminale in vitelli "Ruminal drinking"	pag. 22
1.3.3 Acidosi metabolica in vitelli affetti da diarrea	pag. 23
1.3.4 Sindrome dell'intestino corto nell'uomo	pag. 26
1.3.5 Possibili meccanismi patogenetici dei segni neurologici	pag. 28

SEZIONE B: PROVE SPERIMENTALI

2. <u>PRIMA PROVA SPERIMENTALE: INDUZIONE DI ACIDOSI METABOLICA</u>	pag. 32
2.1 Materiali e metodi	pag. 32
2.2 Risultati	pag. 36

3. SECONDA PROVA SPERIMENTALE: INDUZIONE DI IPER

L-LATTACIDEMIA	pag. 42
3.1 PRIMA PARTE	pag. 42
3.1.1 Materiali e metodi	pag. 42
3.1.2 Risultati	pag. 45
3.2 SECONDA PARTE	pag. 48
3.2.1 Materiali e metodi	pag. 48
3.2.2 Risultati	pag. 51
4. <u>TERZA PROVA SPERIMENTALE: INDUZIONE DI IPER</u>	
D-LATTACIDEMIA	pag. 55
4.1 Materiali e metodi	pag. 55
4.2 Risultati	pag. 58
5. DISCUSSIONI GENERALI	pag. 63
6. CONCLUSIONI	pag. 68
7. BIBLIOGRAFIA	pag. 69
<u>APPENDICE I: TABELLE</u>	pag. 83
<u>APPENDICE II: LAVORI PUBBLICATI O PORTATI A CONGRESSO</u>	
ESTRAPOLANDO I DATI DI QUESTA TESI	pag. 103

INTRODUZIONE

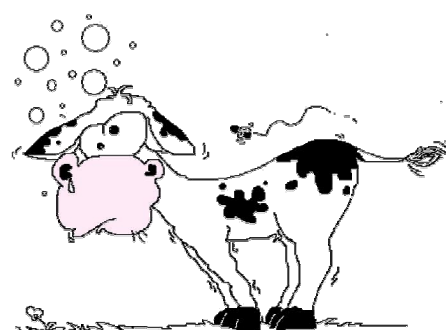
L'acido DL-lattico è un acido insaturo, non volatile, composto di un gruppo carbossilico a tre atomi di carbonio e prodotto da fermentazioni batteriche nei tratti pre-stomacale ed intestinale in condizioni anaerobiche. In condizioni fisiologiche l'acido DL-lattico non diffonde per via ematica, ma viene saturato ad acidi grassi volatili a corta catena (Hove, 1998). Quando, però, un'abnorme quantità di carboidrati facilmente fermentescibili viene degradata da batteri dei tratti pre-stomacale ed intestinale, questo acido si può accumulare ed essere assorbito per via sistemica. Gli isomeri di questa sostanza subiscono nell'organismo dei mammiferi due sorti molto diverse tra loro. L'isomero levogiro si accumula raramente a livello ematico, in quanto è velocemente metabolizzato a piruvato a livello epatico e renale. Al contrario l'isomero destrogiro è metabolizzato lentamente e può accumularsi in circolo fino a provocare effetti neurotossici (Halperin e Kamel, 1996; Ewaschuk et al., 2002). Un incremento delle fermentazioni batteriche può essere potenziato da anoressia, da malassorbimento, che provoca una maggiore disponibilità di substrato fermentescibile per i batteri dei tratti pre-stomacale ed intestinale, o può essere il risultato di una riduzione del transito di questi distretti digestivi. In queste circostanze si incorre in una sovrabbondanza di fermentazioni che porta ad un eccessivo accumulo di acidi organici, che, se assorbiti ed accumulati, producono un'acidosi metabolica.

In bibliografia esistono numerose linee guida empiriche, che suggeriscono come valutare lo stato di acidosi metabolica in base alla sintomatologia clinica di vitelli affetti da diarrea o da acidosi ruminale. Molti Autori hanno, infatti, cercato di individuare dei parametri oggettivi per valutare quantità e qualità di fluidoterapia necessaria per ripristinare lo stato di idratazione e per riequilibrare lo stato acido-base.

I test più affidabili e soddisfacenti per la valutazione clinica dello stato di disidratazione sono, da sempre, considerati essere l'elasticità cutanea e la posizione dei bulbi oculari (Constable et al., 1998) e a questi si sono aggiunti numerosi tentativi di stimare la gravità dell'acidosi metabolica sulla base dei sintomi clinici. Ciò nonostante recentemente sono stati posti alcuni dubbi sulla reale validità dei segni clinici proposti (Lorenz, 2004a). I sintomi segnalati in correlazione con l'acidosi metabolica sono principalmente disturbi della postura e/o dello stato del sensorio (Kasari e Naylor, 1984; Kasari e Naylor, 1985; Kasari e Naylor, 1986; Naylor, 1989; Geishauser e Thünker, 1997; Wendel et al., 2001) e alterazioni del riflesso della suzione (Szenci, 1982; Geishauser e Thünker, 1997; Lorenz, 2004b).

Recenti osservazioni effettuate su vitelli, affetti da diarrea spontanea, hanno però mostrato che le alterazioni dello stato del sensorio e della postura sembrano meglio spiegabili da un incremento dei livelli sierici di D-lattato piuttosto che da un decremento dei valori di base eccesso (BE) (Lorenz, 2004b).

Con il presente studio ci si propone di osservare ed oggettivizzare gli effetti dell'accumulo ematico, sperimentalmente indotto, dell'acido cloridrico, dell'enantiomero L-lattato e del D-lattato, al fine di osservare le manifestazioni cliniche di ogni singola molecola per chiarire il loro ruolo nell'instaurarsi delle manifestazioni cliniche in vitelli affetti da diarrea neonatale o acidosi ruminale. Lo studio complessivo, quindi, comprende tre differenti procedimenti sperimentali, singolarmente riportati.



APPROFONDIMENTO BIBLIOGRAFICO

ACIDOSI LATTICA

1.1 DEFINIZIONE DI ACIDOSI D-LATTICA

L'acidosi D-lattica è una patologia sistemica caratterizzata da un incremento ematico di idrogenioni, causato da un accumulo di acido lattico destrogiro, provocato da una fermentazione pregastro- o gastro-intestinale abnorme e non da un incremento della sua produzione a livello cellulare, tramite la via metabolica del metilgliossale (Oh et al., 1985; Phillips et al., 1985; Thornalley, 1988; Omole et al., 2001). La combinazione di un'aumentata produzione di D-lattato e di un suo metabolismo e/o di una sua escrezione compromessi contribuiscono all'instaurarsi di un'acidosi metabolica (Ewaschuk et al., 2006).

1.2 METABOLISMO DEL DL-LATTATO NELL'ORGANISMO

Il lattato o 2-idrossipropanoato fu descritto per la prima volta nel 1780 da un chimico svedese, Scheele, che lo isolò dal latte acido. Il lattato è l'acido idrossicarbossilico più semplice e ne esistono 2 stereoforme o enantiomeri, che differiscono tra loro per la posizione dell'atomo C2. Tipicamente un enantiomero che ruota la luce in senso orario è chiamato D- o destrogiro mentre l'enantiomero che la ruota in senso antiorario è detto L- o levogiro. Una classificazione alternativa utilizza i simboli + e - sfruttando la somiglianza della molecola alle due forme chirali della gliceraldeide e solitamente le denominazioni (+) e D corrispondono alla stessa molecola chirale. Il lattato si discosta da questa regola, avendo un D-isomero che ruota la luce verso sinistra

ed un L-isomero che la ruota verso destra (Fig. 1). I 2 enantiomeri hanno proprietà chimico-fisiche simili, una pK_a di 3,86 e a pH fisiologico questa molecola si trova liberamente dissociata con un rapporto ione lattato:acido lattico di 3000:1 (Wright e Jamali, 1993).

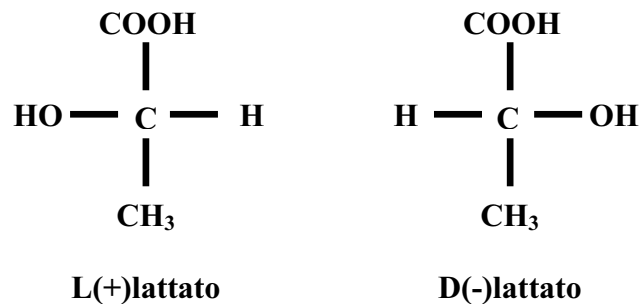


Fig. 1 Enantiomeri del lattato

Le cellule dei mammiferi producono quasi esclusivamente L-lattato che raggiunge una concentrazione sierica fisiologica di 1-2 mmol/L. Il D-enantiomero, al contrario, si rinviene fisiologicamente nell'organismo solo in concentrazioni nanomolari ed è prodotto attraverso il ciclo del metilgliossale. Fonti esogene di D- e L-lattato includono soprattutto cibi fermentati, come crauti, yogurt e verdure sottaceto, e fermentazioni microbiche del colon ma normalmente queste non inducono alterazioni dell'equilibrio acido-base (Ewaschuk et al., 2005).

La concentrazione sierica di D-lattato in vitelli neonati è stata calcolata essere <0,5 mmol/L (Omole et al., 2001) mentre in uomini adulti sani oscilla tra 11 e 70 nmol/L (de Vrese e Barth, 1991; Ohmori e Iwamoto, 1988, McLellan et al.,

1992, Brandt et al., 1980). L'escrezione urinaria è $\sim 0,1 \mu\text{mol/L}$ (Connor et al., 1983) e, nell'uomo, è maggiore nel primo anno di vita per ridursi dall'età di 4 anni (Haschke-Becker et al., 2000).

L'enantiomero L- del lattato è rapidamente metabolizzato a piruvato a livello epatico dall'enzima l-lattico deidrogenasi mentre è riportato spesso in bibliografia che negli organismi mammiferi manca un enzima, la D-lattico deidrogenasi, in grado di metabolizzare l'enantiomero speculare (Connor et al., 1983; Oh et al., 1985). In passato si riteneva, infatti, che il D-lattato fosse metabolizzato a piruvato grazie ad un enzima aspecifico, la D- α -idrossiacido deidrogenasi, che catalizza questa reazione molto più lentamente rispetto alla L-lattico deidrogenasi, in grado di metabolizzare l'isomero L- circa cinque volte più efficacemente (Fig. 2) (Tubbs e Greville, 1961; Cammack, 1969; Giesecke, 1988).

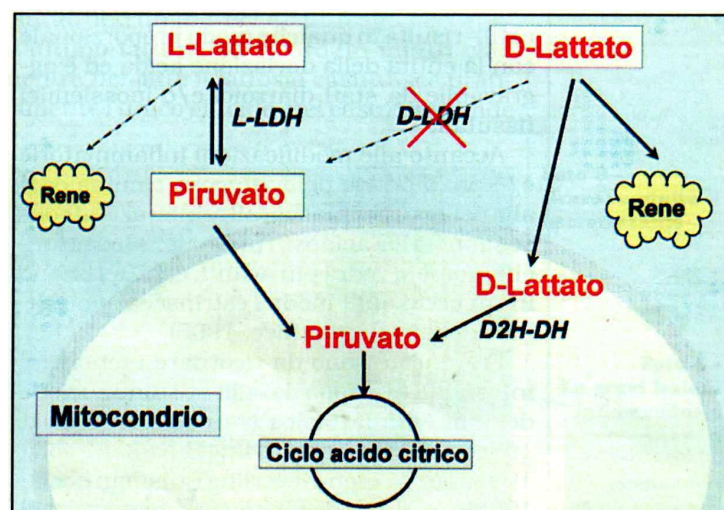


Fig. 2 Schema del metabolismo degli enantiomeri del lattato negli organismi eucarioti

Fino a pochi anni fa, la D-lattico deidrogenasi era stata isolata solo in organismi procarioti (Giesecke e Stangassinger, 1980; Giesecke, 1988), ma recenti studi hanno identificato una D-lattico deidrogenasi putativa presente nei mitocondri umani e murini (Bari et al., 2002; Flick e Konieczny, 2002). I tessuti di ratto e bovino, in effetti, sembrano possedere, secondo questi studi, un'elevata capacità di metabolizzare il D-lattato *in vitro* (Giesecke et al., 1980; Harmon et al., 1984). Questa molecola svolge funzioni anapleurotiche nella cellula poiché il suo trasporto all'interno della membrana mitocondriale esita nella fuoriuscita di ossal-acetato e malato nel citosol. Il trasporto del D-lattato, da quest'ultimo alla matrice mitocondriale, gli permette di essere ossidato dalla D-lattico deidrogenasi putativa. Quest'ultimo enzima è stato riscontrato sul lato interno della membrana mitocondriale (Bari et al., 2002). Gli stessi autori hanno inoltre identificato tre nuovi trasportatori che permettono al D-lattato di penetrare la membrana mitocondriale: il simporto D-lattato/H⁺, l'antiporto D-lattato/ossalacido e l'antiporto D-lattato/malato.

In letteratura esistono notevoli controversie riguardanti il metabolismo e l'escrezione del D-lattato nei mammiferi. L'opinione convenzionale è che il D-lattato non sia adeguatamente metabolizzato e che venga escreto per la maggior parte attraverso le urine (Judge e Van Eys, 1962; Stangassinger e Giesecke, 1978; Vella e Farrugia, 1998; Haschke-Becher et al., 2000; Zhang et al., 2003). Queste ipotesi si basano essenzialmente sugli studi di Cori eseguiti verso la fine degli anni '20 (Cori e Cori, 1929), confermati 40 anni dopo (Medzihradsky

e Lamprecht, 1966), che dimostravano che il D-lattato è scarsamente metabolizzato e che il 30-40% della molecola ingerita è escreta attraverso le urine, ove non si riscontra l'enantiomero L-. Studi eseguiti in seguito, negli anni '80 e '90, misero in discussione questi risultati e dimostrarono, attraverso l'utilizzo di D-lattato o di D-lattato marcato con ^{14}C , che questa molecola è metabolizzata velocemente (Giesecke et al., 1981; Oh et al., 1985; Giesecke e Wallenberg, 1985). Ciò nonostante le prime dimostrazioni del metabolismo dell'D-lattato continuano ad essere quelle maggiormente citate nella letteratura moderna.

Secondo uno studio, eseguito su 10 volontari (Oh et al., 1985), ai quali fu somministrato sodio DL-lattato per via endovenosa alla concentrazione di 1,0-1,3 mmol/(kg*h), risultò in effetti che solo il 10% del D-lattato è escreto attraverso le urine mentre il 90% è metabolizzato. Questo stesso studio dimostrò che, incrementando la velocità di infusione a 3,0-4,6 mmol/(kg*h), la quota di D-lattato metabolizzata si riduce notevolmente fino al 75% . In seguito alcuni Autori (de Vrese et al., 1990) determinarono che l'emivita del D-lattato in soggetti sani è di 21 minuti, se somministrato per via orale alla dose di 6,4 mmol/kg. Raddoppiando il dosaggio somministrato, osservarono un incremento dell'emivita fino a 40 minuti e lo giustificarono come una sorta di saturazione del suo metabolismo. Contrariamente agli studi precedenti, però, solo il 2% del D-lattato somministrato in quell'esperimento era escreto attraverso le urine nel corso delle 24 ore successive l'ingestione della molecola

(Giesecke et al., 1985; de Vrese et al., 1990). Altri studi eseguiti con la somministrazione di D-lattato marcato con ^{14}C in alcuni ratti evidenziarono che 3,7% della dose totale è escreta per via renale mentre l'85% dell'escrezione avviene attraverso l'*espirium*, ove riscontrarono $^{14}\text{CO}_2$ (Giesecke et al., 1981). Il dosaggio di D-lattato utilizzato in questo studio (300 μmol di sodio D-lattato/ratto) era però molto inferiore a quello utilizzato da Cori nei suoi esperimenti (19 mmol/kg) ed inoltre la somministrazione avvenne sia per via orale sia per via intraperitoneale anziché solo per somministrazione forzata, come nella studio di Cori, per cui fare confronti tra i due esperimenti risulta abbastanza infruttuoso (Ewaschuk et al., 2005). Ciò nonostante uno studio successivo in cui sono stati somministrati 13,4 mmol/kg per via intragastrica ha dimostrato che solo lo 0,9% della dose totale è escreto per via renale, il 2,4% è metabolizzato e il 30-45% viene eliminato con $^{14}\text{CO}_2$ espirata (Giesecke e Wallenberg, 1985). Il restante 54-68% del ^{14}C somministrato non fu più rintracciato nell'organismo per cui gli Autori ipotizzarono che il D-lattato potesse essere stato in parte metabolizzato a piruvato e acetil CoA ed in parte escreto, senza essere assorbito, attraverso le feci o metabolizzato dalla flora intestinale (Giesecke e Wallenberg, 1985). Questi stessi Autori osservarono, inoltre, che la diversa via di somministrazione modificava notevolmente il metabolismo e l'escrezione della molecola di D-lattato: con un'infusione parenterale, infatti, la percentuale di ^{14}C non più riscontrabile (8%) era molto inferiore rispetto a quella osservata con una somministrazione enterale (54-

68%). Una possibile spiegazione dell'enorme disparità tra i risultati dei primi esperimenti e quelli degli studi più recenti può trovare riscontro nell'avvento di nuove metodiche di isolamento del D-lattato, che sono passate dalle prime tecniche colorimetriche, non stereoselettive, che avevano una sensibilità molto bassa (Friedemann et al., 1927; Backer e Summerson, 1941), all'attuale HPLC (High-performance liquid chromatography) stereospecifica ed ai metodi elettroforetici capillari (Omole et al., 1999; Ewaschuk et al., 2002; Ewaschuk et al., 2004a; Saavedra e Barbas, 2002). Un'altra spiegazione potrebbe essere attribuita alle differenze nella metabolizzazione del lattato osservate tra le varie specie. Il riassorbimento renale del D-lattato nell'uomo, infatti, è stato osservato non essere così efficiente come nel cane (Oh et al., 1985; Craig, 1946). In alcune specie coprofighe, quali il coniglio ed il ratto, il D-lattato è stato persino identificato come un isomero fisiologico, a causa dell'elevata produzione gastrica ed allo stesso tempo, anche tra queste due specie, sono state identificate differenze nel grado di ossidazione e nell'escrezione renale (Giesecke et al., 1981). I ratti sono comunque stati oggetto della maggior parte degli esperimenti eseguiti sul metabolismo del lattato (Cori e Cori, 1929; Brandt et al., 1980; Giesecke et al., 1981; Giesecke e Wallenberg, 1985; Bari et al., 2002) ma sembra che questi risultati non siano applicabili ad altre specie, per cui si renderebbe necessario uno studio con isotopi stabili in ciascuna specie (Ewaschuk et al., 2005).

I pochi studi presenti in bibliografia eseguiti sull'uomo hanno dimostrato che i due enantiomeri del lattato interferiscono tra loro sul loro riassorbimento renale in base alla loro concentrazione ematica; in ogni caso è stato osservato che anche ad alte dosi, il riassorbimento dell'isomero L- supera sempre il 70% mentre il riassorbimento della forma D- non supera mai il 50%, anche a basse dosi. È stato inoltre evidenziato che se la concentrazione ematica di quest'ultimo supera 3,0 mmol/L, il suo riassorbimento tubulare si riduce notevolmente, non superando mai il 30%. È stato osservato infine che il riassorbimento del DL-lattato avviene per mezzo di un cotrasporto Na⁺-mediato, contro gradiente elettrochimico, utilizzato da entrambi gli enantiomeri. Questo sistema attivo sembra essere la causa dell'interferenza del reciproco riassorbimento (Oh et al., 1985).

L'isomero D- è trasportato all'interno di numerosi tessuti mediante dei trasportatori monocarbossilati protoni-dipendenti (da MCT^{*}-1 fino a MTC-8) (Enerson e Drewes, 2003). I MTC sono espressi in numerosi tessuti e sono stati identificati nella retina, muscoli, reni, cellule endoteliali dei capillari cerebrali, miociti cardiaci, enterociti, epatociti, eritrociti, timociti, nella placenta e nel tessuto nervoso (Enerson e Drewes, 2003; Poole e Halestrap, 1993).

Nell'organismo mammifero esiste una minima produzione endogena di D-lattato, risultato del metabolismo del metilglicosale.

* Monocarboxylate transporters

Il metilgliossale è formato in modiche quantità dal catabolismo di carboidrati, grassi e proteine (Fig. 3) ma a causa della sua natura tossica e reattiva deve essere velocemente eliminato dall'organismo (Kalapos, 1999). Il ciclo del gliossale è un processo biochimico che catalizza la conversione del metilgliossale a D-lattato attraverso la produzione di un intermedio, l's-D-lactoilglutazione, grazie all'intervento di due enzimi: la gliossalasi I e la gliossalasi II (Brandt e Siegel, 1979; Thornalley, 1990; Phillips and Thornalley, 1993; Thornalley et al., 1999). Questa reazione ubiquitaria avviene nel citosol ed in alcuni orfanelli cellulari, in modo particolare nei mitocondri (Thornalley, 1990). Alcuni Autori hanno, in effetti, proposto l'utilizzo del D-lattato come indicatore stabile del metabolismo del metilgliossale (Hasegawa et al., 2003). I valori sierici di D-lattato riportati in vari studi sul metabolismo del metilgliossale oscillano tra valori micro- o nanomolari che generalmente non contribuiscono all'acidemia. È stato però dimostrato che un'ingestione prolungata nel tempo (22 giorni) di elevate dosi di glicole propilenico (8g/kg) in un gatto ha innalzato il livello sierico di D-lattato fino a valori di 7 mmol/L, dimostrando che anche il catabolismo del metilgliossale, in condizioni estreme, può provocare un'acidosi metabolica (Christopher et al., 1990).

A fronte di questo però, l'assorbimento intestinale è la fonte maggiore di D-lattato dell'organismo ed avviene a livello di piccolo intestino e del colon (Ding e Xu, 2003; Preston e Noller, 1973) attraverso un MTC-1, che possiede una capacità di captazione dell'L-lattato doppia rispetto a quella del D-lattato

ed un effetto inibitorio reciproco (Tamai et al., 1995). Entrambi gli isomeri sono normalmente prodotti negli organi fermentativi dei tratti prestomacale ed intestinale: rumine, cieco e colon, principalmente da lattobacilli e bifidobatteri*. In condizioni fisiologiche il DL-lattato non provoca alterazioni dell'equilibrio acido-base poiché è velocemente convertito dalla flora intestinale ad acetato ed altri acidi grassi a corta catena (Møller et al., 1997). Il beneficio maggiore apportato da questi acidi organici ai vari distretti digestivi, ove è presente, è quello di fornire energia per il metabolismo ossidativo e ioni per le cellule della mucosa. Il propionato assorbito è in seguito captato dal fegato e convertito a glucosio, trigliceridi e anidride carbonica mentre il butirato è ossidato dalle cellule mucosali del rumine e/o del colon per la produzione di ATP (Dunlop e Hammond, 1965; Møller et al., 1997). Questo sistema di assorbimento e metabolismo del DL-lattato è un sistema in equilibrio regolato dallo svuotamento prestomacale-gastrico e dalla digestione ed assorbimento dei carboidrati a livello di piccolo intestino ma che, in corso di alcune patologie, sia nei ruminanti sia nell'uomo, può andare incontro ad alterazioni dovute ad un abnorme afflusso di carboidrati facilmente fermentescibili (Ewaschuk et al., 2005).

* *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus ruminis*, *L. vitulinus*, *Ruminococcus albus*, *R. flavifaciens*, *Eubacterium cellulosolvens*, *E. ruminantium*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Lachnospira multiparus* (Gnude, 1999)

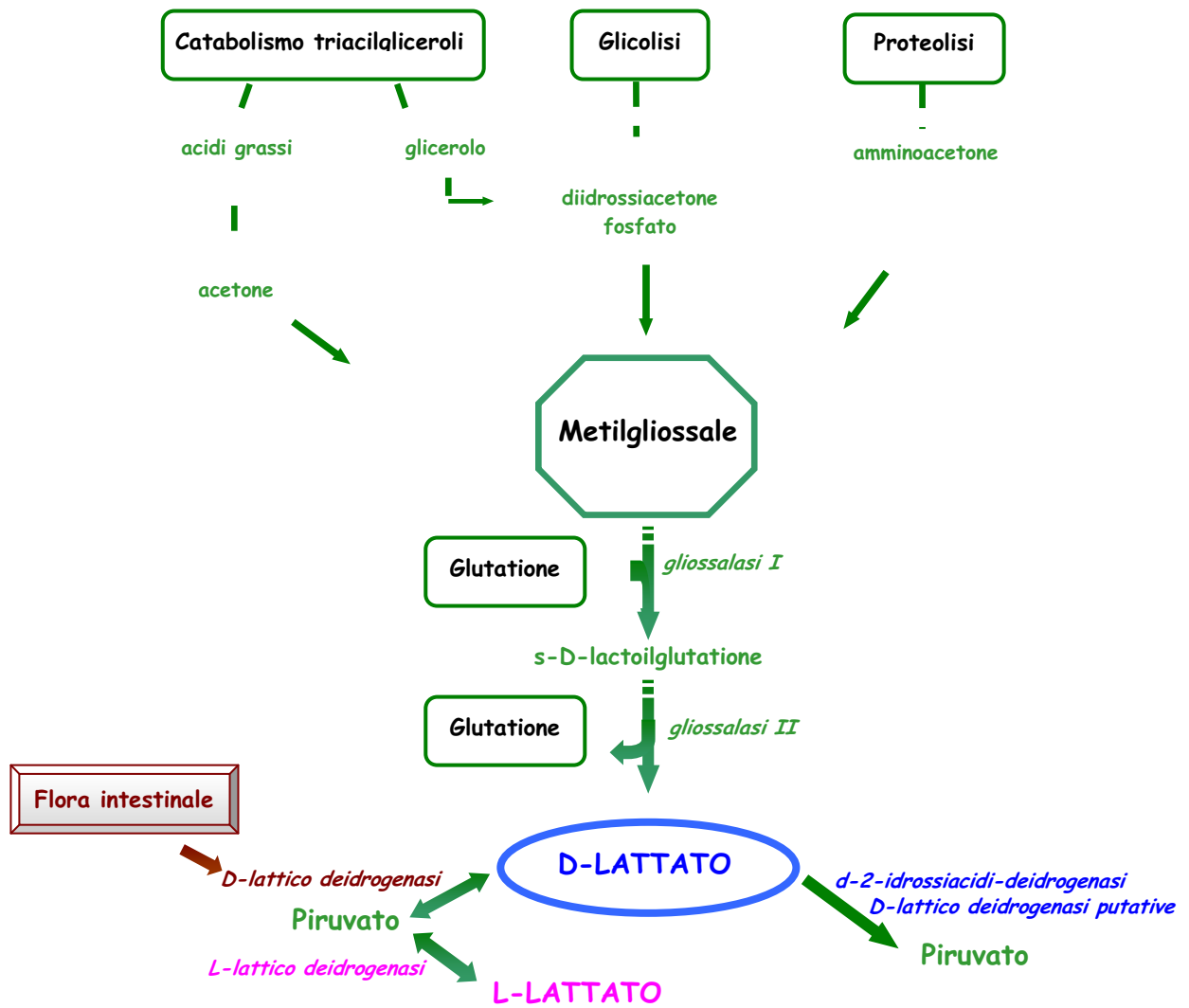


Fig. 3 Ciclo del metilgliossale

1.3 MANIFESTAZIONI CLINICHE DI ACIDOSI NEI RUMINANTI E NELL'UOMO

L'acidosi D-lattica è un'evenienza clinica rara sia nell'uomo, ove si manifesta come conseguenza della cosiddetta "sindrome dell'intestino corto" (SBS), sia nel bovino. In quest'ultima specie si osserva come manifestazione tipica, sia dell'adulto, in corso di acidosi ruminale acuta, causata da eccessiva ingestione di cereali (Dunlop e Hammond, 1965), sia del giovane vitello nei casi "ruminal drinking" come conseguenza di acidosi ruminale (Gentile et al., 2004), sia in corso di grave gastroenterite (Omole et al., 2001). Recentemente è stata inoltre identificata in un gatto con insufficienza pancreatica, evento considerato particolarmente raro poiché i felini sono carnivori puri (Packer et al., 2005).

Per acidosi D-lattica si intende un incremento ematico di idrogenioni accompagnato da un accumulo di D-lattato, che si rinviene in concentrazioni >3 mmol/L (Uribarri et al., 1998). La produzione e l'accumulo di D-lattato e l'acidosi possono essere causati sia da un incremento della produzione endogena, come in corso di chetoacidosi diabetica o di avvelenamento da glicole etilenico, che causa un rallentamento del suo catabolismo, sia a causa di un'eccessiva produzione di fermentazioni batteriche nel tratto gastroenterico. L'interesse clinico per l'acidosi metabolica è dovuto al fatto che nei casi gravi può indurre a morte l'animale per alterazioni della struttura e della funzione delle proteine che svolgono funzioni essenziali nell'organismo o per alterazioni

del rapporto del potassio intra- ed extracellulare nei miociti, inducendo insufficienza cardiaca (Weddon et al., 1992).

1.3.1 ACIDOSI RUMINALE NEL RUMINANTE ADULTO

Questa patologia si presenta quando ha luogo un'eccessiva fermentazione di carboidrati da parte di batteri anaerobi presenti nel rumine ed è stata segnalata per la prima volta nel 1965 e poi ampiamente studiata nel bovino (Dunlop e Hammond, 1965; Dirksen, 1985; Møller et al., 1997; Owens et al., 1998), nei piccoli ruminanti (Braun et al., 1992) oltre che in camelidi e bufali (Cebra et al., 1996; Nikolov, 1998).

Un apporto eccessivo di concentrati o di alimenti contenenti zucchero, causato da un errore alimentare o da un incidente manageriale, porta ad una grave acidosi ruminale che può evolvere in un'acidosi D-lattica. L'acidosi ruminale acuta causa un danno alla mucosa ruminale ed intestinale con conseguente riassorbimento massivo di acido DL-lattico e successiva disidratazione. Mentre la forma cronica si manifesta con una sintomatologia più lieve, come riduzione dell'appetito, dell'assorbimento dei nutrienti e, conseguentemente, delle performances dell'animale (Owens et al., 1998). Un'ingestione massiva di carboidrati facilmente fermentescibili porta ad una loro fermentazione eccessiva a livello ruminale che esita nella produzione ingente di acidi grassi a corta catena e di acido DL-lattico (McLellan et al., 1992; Møller et al., 1997). In queste condizioni si osservano concentrazioni ruminali di questo acido

superiori a 300 mmol/L che possono ripercuotersi in concentrazioni sieriche di DL-lattato di 25 mmol/L (Møller et al., 1997). In quanto sostanza osmoticamente attiva, queste elevate concentrazioni di acido lattico ruminale portano ad un richiamo di liquidi nel rumine con conseguente disidratazione del soggetto. Alcuni Autori suggeriscono che le concentrazioni elevate di D-lattato sono associate a segni di neurotossicità, quali letargia, atassia e nistagmo (Dunlop e Hammond, 1965; Møller et al., 1997). In questo contesto è stato osservato che anche le fermentazioni coloniche possono contribuire all'acidosi sistemica (Žust et al., 2000).

Esistono però in letteratura alcune controversie sulla capacità del rumine di assorbire l'acido lattico. Studi eseguiti sia *in vivo* sia *in vitro* indicano un'elevata capacità assorbitiva (Dunlop e Hammond, 1965; Preston e Noller, 1973; Møller et al., 1997). Sull'epitelio ruminale è espressa infatti una MCT-1, presente sulla membrana basale che rimuove il DL-lattato ed i protoni dal rumine per portarli, attraverso il citoplasma, nel torrente circolatorio (Müller et al., 2002). Altri studi invece dimostrarono che né la forma L- né la forma D- sono assorbite dal rumine e dal cieco degli ovini (Ding et al., 1998) ma piuttosto dal piccolo intestino (Ding e Xu, 2003). In passato fu evidenziato che il lattato non poteva essere assorbito dal rumine in cui il pH era inferiore a 4 (Dobson e Philipson, 1956) ma questo fu poi smentito da studi successivi che dimostrarono l'assenza di alcun impedimento al riassorbimento del D-lattato ruminale in funzione del decremento del pH (Williams e Mackenzie, 1965).

1.3.2 ACIDOSI RUMINALE IN VITELLI “RUMINAL DRINKING”

Il vitello neonato presenta, come il bovino adulto, quattro camere prestomacali anche se sviluppate in proporzioni diverse. Il rumine ed il reticolo del vitello sono infatti camere non funzionali fino all'età di circa 40 giorni (Anderson et al., 1987) ed il latte giunge direttamente nell'abomaso tramite la doccia esofagea. L'acidosi D-lattica è stata osservata come conseguenza principale in soggetti *ruminal drinking* (Dirr e Dirksen, 1989; Gentile et al., 1997; Grude et al., 1999). In questi soggetti si osserva un accumulo di latte a livello ruminale, non solo per una disfunzione della doccia esofagea (Wise et al., 1984), ma anche per alimentazione forzata tramite sonda o bottiglia (Cleek e Phillips, 1981; Dirksen e Baur, 1991) od in corso di varie patologie, quali polmoniti, onfaliti o ernie ombelicali, otiti, trombo-flebiti giugulari, processi infiammatori locali a carico della mucosa rumino-reticolare (Gentile et al., 1997) o in corso di anoressia essenziale o *sine materia* (Dirksen, 2002). Alcuni Autori osservarono che anche fattori psichici possono attenuare lo stimolo riflesso di chiusura della doccia esofagea, in modo particolare lo stress provocato da lunghi trasporti, dal cambiamento di ambiente, della modalità di alimentazione e della qualità e quantità di alimento (van Bruinessen-Kapsenberg et al., 1982; van Weeren-Keverling-Buisman, 1989). Nel rumine si osserva la fermentazione massiva del lattosio che porta ad un decremento del pH (Baur, 1993), favorendo così la produzione di acido DL-lattico, che assorbito, conduce ad una conseguente acidosi D-lattica. Alcuni Autori hanno

recentemente dimostrato che somministrando il latte direttamente nel ruminante esita una grave sintomatologia sistemica, causata da acidosi D-lattica (Gentile et al., 2004).

Come nell'adulto, il vitello può andare incontro ad una patologia acuta o cronica. La forma acuta compare soprattutto nei soggetti più giovani ed in presenza di patologie concomitanti e si manifesta con notevole depressione dello stato del sensorio, tendenza al decubito e grave disidratazione fino al collasso cardio-circolatorio (Gentile et al., 1997; Gentile, 2004). L'alimentazione è sospesa con assenza del riflesso della suzione e presenza di altre alterazioni neurologiche, come masticazioni a vuoto, movimenti continui della lingua e bruxismo (Dirksen e Garry, 1987).

La forma cronica si osserva soprattutto come conseguenza di fattori stressanti (van Bruinessen-Kapsenberg et al., 1982). Questa forma ricalca la sintomatologia osservabile nel ruminante adulto, con riduzione dell'appetito, ridotto accrescimento, feci cretacee ed alopecia localizzata soprattutto a livello di testa e arti posteriori (Gentile et al., 1997).

1.3.3 ACIDOSI METABOLICA IN VITELLI AFFETTI DA DIARREA

Storicamente l'acidosi osservabile nei vitelli con diarrea è stata sempre attribuita ad una perdita di bicarbonati con le feci e ad un accumulo ematico di L-lattato (Kasari e Naylor, 1985; Booth e Naylor, 1987; Grove-White, 1996; Kasari, 1990). Era infatti ipotizzato che la disidratazione indotta dalla diarrea potesse esitare in un'ipossia tissutale ed in una conseguente glicolisi

anaerobica. Alcuni Autori riferivano che l'L-lattato fosse l'acido organico maggiormente presente nel circolo ematico di soggetti diarroici (Tennant et al., 1972). I primi dubbi insorsero quando alcuni lavori documentarono la presenza di acidosi metabolica in soggetti ben idratati per cui si è reso necessario indagare l'eventuale ruolo di altri acidi organici (Kasari e Naylor, 1984; Kasari e Naylor, 1986; Schelcher et al., 1998; Kasari, 1999; Zello et al., 1999). Attualmente è noto che circa il 64% dell'incremento totale degli acidi organici, misurato attraverso il calcolo del disavanzo anionico[♦], è rappresentato dal D-lattato (Ewaschuk et al., 2003; Ewaschuk et al., 2004b; Lorenz, 2004a; Lorenz, 2004b). Questi soggetti possono raggiungere concentrazioni ematiche di D-lattato molto elevate, fino a 25 mmol/L (Ewaschuk et al., 2004b), a causa di un'abnorme fermentazione, soprattutto a carico del grosso intestino. Alcuni studi riportano, inoltre, che qualche soggetto può produrre D-lattato anche a livello ruminale (Grude et al., 1999; Ewaschuk et al., 2004b).

Il meccanismo d'azione è ascrivibile ad una maldigestione dei carboidrati, causata da un'atrofia dei villi intestinali virus-indotta, che raggiungono il colon tal quali. Inizialmente questo provoca un incremento della produzione di acidi organici, che inducono una riduzione del pH intraluminale. Questo ambiente acido favorisce prevalentemente la crescita di lattobacilli, che attraverso varie fermentazioni, producono acido DL-lattico ed il D-lattato si accumula a livello sistemico a seguito di un assorbimento di entrambi gli enantiomeri (Hove e

[♦] $[(\text{Na}^+) + (\text{K}^+) - [(\text{Cl}^-) + (\text{HCO}_3^-)]]$

Mortensen, 1995). Quando la produzione di acido D-lattico eccede la capacità corporea di metabolizzazione e di escrezione del D-lattato, questo enantiomero si accumula a livello sistemico, esitando in un'acidosi metabolica (Hove e Motensen, 1995). In alcuni soggetti è stato anche riportata una disfunzione della doccia esofagea, che provoca un'eccessiva fermentazione ruminale ed un'ulteriore produzione di acido D-lattico (Grude et al., 1999). L'assorbimento del D-lattato dal lume intestinale avviene attraverso un MCT-1 protone-dipendente e può esacerbarsi a causa dell'elevata concentrazione protonica, provocata dalle eccessive fermentazioni batteriche. Questo, associato ad un decremento della funzione protettiva, causato dall'invasione dei patogeni e dallo stato infiammatorio, può portare ad un maggior assorbimento di D-lattato ed a sue concentrazioni ematiche molto elevate, osservate in alcuni soggetti diarroici (Ewaschuk et al., 2005). Altro fattore aggravante è la disidratazione, molto frequente in questi soggetti, che riducendo l'escrezione idrogenionica renale, esacerba lo stato acidogeno (Ewaschul et al., 2005). Secondo gli stessi Autori questa possibilità potrebbe essere un'evenienza anche nei soggetti monogastrici diarroici, incluso l'uomo, anche se non supportata da altra bibliografia. L'atrofia dei villi e il malassorbimento sono, infatti, certamente presenti in soggetti umani affetti da diarrea virale ma non è mai stato valutato se questo possa causare una fermentazione intestinale tale da provocare un'iper D-lattacidemia (Ewaschuk et al., 2005). L'acidosi metabolica è stata in effetti descritta in soggetti affetti da diarrea da rotavirus e fu attribuita a

malassorbimento di carboidrati e non fu comunque osservata l'effettiva concentrazione ematica di D-lattato (Sack et al., 1982).

1.3.4 SINDROME DELL'INTESTINO CORTO NELL'UOMO

Negli anni 90 furono esplicitate le somiglianze eziopatogenetiche tra la SBS e l'acidosi lattica ruminale acuta, sia dell'adulto (Editoriale, 1990) sia del vitello (Gentile e Rademacher, 1998), in cui il colon e il rumine sono stati individuati come due camere di fermentazione con pH, flora e potenziale ossido-riduttivo simili (Editoriale, 1990). Il primo episodio di acidosi D-lattica fu descritto nel 1979 in seguito a resezione di parte del piccolo intestino (Oh et al., 1979). Esistono infatti numerose patologie che richiedono come terapia la resezione chirurgica dell'intestino, tra queste difetti congeniti, enterocolite necrotizzante, obesità, volvoli, gangrena o trauma intestinali (Petersen, 2005). Nei pazienti sottoposti a resezione estesa del piccolo intestino, in cui meno di 150 cm di intestino è stato lasciato *in situ* vi è un elevato rischio di disturbi metabolici e nutrizionali che sono stati classificati come sindrome dell'intestino corto (Uribarri et al., 1998). La SBS causa un'alterazione della digestione della proteine, dei lipidi, dei carboidrati, delle vitamine, degli elettroliti, dei minerali e dei liquidi. Associato a ciò si osserva comunemente diarrea, disidratazione, disturbi dell'equilibrio acido-base e deficienze nutrizionali, che spesso devono essere corrette con nutrizione parenterale (Petersen, 1995).

L'acidosi D-lattica è spesso associata a disturbi neurologici che si manifestano con concentrazioni ematiche di D-lattato superiori a 2,5-3 mmol/L (Uribarri et

al., 1998). I pazienti affetti da SBS vanno incontro a disfunzioni neurologiche aspecifiche, quali atassia, incoordinazione degli arti superiori, logopatia in particolare disartria e stato confusionale con sonnolenza e perdita di memoria associate ad acidosi metabolica con disavanzo anionico elevato (Thurn et al., 1995; Uribarri et al., 1998; Petersen, 2005). In alcuni pazienti sono stati anche osservati emicrania, allucinazioni, vertigini, nistagmo, offuscamento della vista, oftalmoplegia, disorientamento ed ottundimento del sensorio, talvolta associati a letargia, eccessiva irritabilità e aggressività, con possibilità di perdurare da poche ore a diversi giorni (Thurn et al., 1995; Uribarri et al., 1998). Come già accennato, la patogenesi di questa sindrome ricalca quella del vitello in corso di diarrea neonatale, ove i carboidrati non assorbiti dal piccolo intestino giungono tal quali nel colon, in cui possono fermentare e creare un milieu favorevole alla proliferazione di lattobacilli, produttori di acido DL-lattico, che viene successivamente assorbito (Oh et al., 1979; Dahlquist et al., 1984; Hudson et al., 1990; Uribarri et al., 1998). Alcuni Autori hanno, inoltre, isolato nelle feci di questi pazienti alcuni lattobacilli produttori di una DL-lattico racemasi, capace di convertire l'enantiomero L- in D-, con conseguente aggravamento dell'accumulo ematico di D-lattato (Hove e Mortensen, 1995; Caldarini et al., 1996). Il trattamento dell'acidosi D-lattica in corso di SBS prevede, oltre alla somministrazione di bicarbonato e di fluidi per via parenterale, come in patologia bovina, l'eliminazione della somministrazione di carboidrati e la somministrazione orale di antibiotici non assorbibili. È

riportato però in bibliografia che l'ampio uso di questi antibiotici può provocare acidosi D-lattica promuovendo la crescita e la proliferazione di batteri D-lattato-produttori ed antibiotico-resistenti (Coronado et al., 1995). Questa forma di acidosi sembra però risolversi spontaneamente tramite sospensione della somministrazione antibiotica (Karton et al., 1997; Jeppensen e Mortensen, 1999). Sono riportati anche casi di nutrizione parenterale a lungo termine ma è sempre preferita la somministrazione di alimento per via enterale poiché quest'ultima favorisce l'adattamento dell'intestino al nuovo contenuto luminale (Karton et al., 1997; Vanderhoof and Langnas, 1997). Secondo alcuni Autori anche l'uso di probiotici tradizionali, come il *Lactobacillus acidophilus*, è da evitare (Oh et al., 1979) mentre si sta sempre più diffondendo l'uso di lattobacilli L-lattato produttori, sia in medicina umana (Gavazzi et al., 2001; Eizaguirre et al., 2002; Ewaschuk e Dielemann, 2006) che bovina (Ewaschuk et al., 2004c; Ewaschuk et al., 2006).

1.3.5 POSSIBILI MECCANISMI PATOGENETICI DEI SEGNI NEUROLOGICI

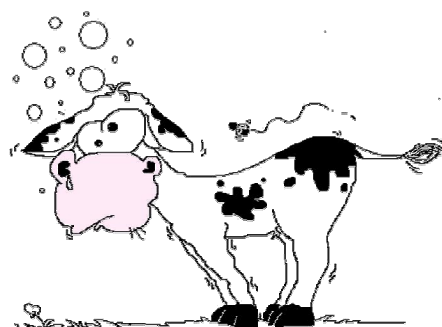
Come già accennato i principali segni clinici riportati in corso di acidosi D-lattica nell'uomo sono alterazione dello stato mentale, atassia, disartria, disorientamento e debolezza (Thurn et al., 1995; Uribarri et al., 1998; Petersen, 2005). L'origine di questa sintomatologia è stata spesso discussa e sono stati individuati due possibili meccanismi patogenetici: il D-lattato potrebbe avere effetti tossici sull'encefalo oppure altre sostanze, prodotte in corso di questa patologia, potrebbero avere effetti neurotossici. L'acidosi metabolica era stata

inizialmente annoverata come causa di questi segni neurologici ma in effetti non in tutti i tipi di acidosi, compresa l'acidosi L-lattica, sono state osservate queste ripercussioni; per cui è stato ipotizzato un effetto neurotossico del D-lattato. Questo enantiomero è in grado di passare la barriera emato-encefalica (Oldendorf, 1971) per diffusione semplice, con un meccanismo, quindi, non saturabile (LaManna et al., 1993), ed è stato rilevato anche nel liquido cefalorachidiano di soggetti umani (Duran et al., 1977) e bovini (Zello et al., 2005) affetti da acidosi D-lattica. In base a queste osservazioni è stato ipotizzato un effetto tossico diretto del D-lattato con interferenze sul metabolismo del piruvato (Gurevitch et al., 1993). In effetti l'encefalo utilizza il glucosio come fonte primaria di energia. Elevate concentrazioni di D-lattato sembrano alterare il pH intraneuronale, abbassandolo, e questo interferisce con la decarbossilazione del piruvato, riducendo la produzione di acetil CoA e adenosina trifosfato, fino ad un'alterata produzione dei neurotrasmettitori. I sintomi cerebellari sembrano essere dominanti poiché il cervelletto contiene fisiologicamente minime riserve di piruvato deidrogenasi. Ad affrancare queste ipotesi, secondo gli stessi Autori, è la sovrapposizione tra la sintomatologia neurologica centrale in corso di acidosi D-lattica e quella in corso di patologie congenite o acquisite del metabolismo del piruvato (Cross e Callaway, 1984; Vella e Farrugia, 1998).

In alternativa altri Autori (Thurn et al., 1985) riferiscono che altri prodotti della fermentazione batterica, quali mercaptani, aldeidi, alcoli, amine ed endotossine

potrebbero essere la causa di questa sintomatologia, agendo come falsi neurotrasmettitori (Halperin e Kamel, 1996).

In conclusione il D-lattato è considerato come l'isomero "non fisiologico" del lattato, con un ruolo importante in numerosi aspetti del metabolismo dei ruminanti e dei monogastrici ma che è, soprattutto, la chiave clinica di alcune patologie legate ad un'eccessiva assunzione di carboidrati facilmente fermentescibili ed al malassorbimento intestinale.



PROVE SPERIMENTALI

PRIMA PROVA SPERIMENTALE

INDUZIONE DI ACIDOSI METABOLICA

2.1 MATERIALI E METODI

In questa prova sono stati utilizzati 15 vitelli sani di razza Frisona stabulati liberamente su una lettiera di paglia ed alimentati con latte ricostituito, somministrato attraverso un secchio con tettarella, tre volte al giorno: alle ore 8:00, 13:00 e 18:00. La loro età al momento dell'inizio della prova variava tra i 5 e i 19 giorni ($11,2 \pm 3,6$ giorni) ed il loro peso tra 25 e 52 kg ($40,8 \pm 8,5$ kg). I vitelli sono stati fatti ambientare alla nuova stabulazione per almeno due giorni e durante questo periodo tutti i soggetti presentavano appetito e feci nella norma.

Il giorno della sperimentazione i soggetti sono stati lasciati a digiuno per 6 ore e sono stati applicati due cateteri endovenosi (FEP radio-opaco, non pirogeno, 14G [2,0 x 70 mm]; Delta Med Medical Services) in entrambe le vene giugulari. Il sito di inserzione è stato precedentemente rasato e disinfettato per un'applicazione sterile del catetere.

L'acidosi metabolica è stata indotta attraverso l'infusione endovenosa di 4000 ml di una soluzione di acido cloridrico 0,1 M (per un totale di 400 mmol/L) per un periodo di 80 minuti, corrispondente ad una velocità di infusione di 50 ml/min (5 mmol/min). La soluzione è stata preparata aggiungendo 100 ml di soluzione di acido cloridrico 1 M a 900 ml di soluzione NaCl 0,9% ed è stata

iniettata unilateralmente, dopo averla intiepidita. La vena giugulare controlaterale è stata utilizzata per raccogliere campioni di sangue prima dell'inoculazione (T0), ad intervalli di 20 minuti durante il periodo di infusione (T20, T40, T60, T80) ed in seguito a differenti intervalli dopo il termine della somministrazione: T90, T100, T110, T120, T130, T140, T150, T180, T210, T270, T390.

Il catetere endovenoso utilizzato per prelevare i campioni è stato pulito tramite aspirazione e reiniezione di sangue per 30 secondi prima di ogni campionamento.

Le condizioni cliniche sono state valutate prima dell'inizio della prova, a brevi intervalli durante e al termine dell'inoculazione e il periodo di osservazione è stato protratto fino all'ultimo prelievo di sangue (T390). Attenzione particolare è stata rivolta alle variazioni della postura, allo stato del sensorio e ai riflessi palpebrale e della suzione, secondo lo schema illustrato in tabella 1. Immediatamente dopo il termine della somministrazione, i vitelli sono stati liberati dalla contenzione alla cavezza e sono stati lasciati muovere liberamente. In seguito è stato loro offerto il pasto, 1,5 L di latte ricostituito, attraverso un secchio con tettarella. Stato del sensorio, andatura, appetito e quantità di latte assunto sono stati registrati.

Su campioni di sangue eparinizzato, immediatamente dopo il prelievo, è stata eseguita un'emogasanalisi (ABL 700, Radiometer, Copenhagen, Danimarca) per valutare potenziali variazioni dell'equilibrio acido-base. Sono stati

determinati i seguenti parametri: pH, pCO₂, bicarbonato di sodio (HCO₃⁻), base eccesso (BE). Sul medesimo campione sono state valutate le concentrazioni di L-lattato, sodio (Na⁺), potassio (K⁺) e cloro (Cl⁻).

Il valore di disavanzo anionico è stato calcolato nel modo seguente:

$$[(\text{Na}^+) + (\text{K}^+)] - [(\text{Cl}^-) + (\text{HCO}_3^-)].$$

Le concentrazioni di L- e D-lattato sono state determinate sul plasma di campioni raccolti in provette contenenti un anticoagulante glucostatico, EDTA-KF, e centrifugate immediatamente.

Il plasma è stato conservato a -20°C fino al momento dell'analisi, eseguita con metodo spettrofotometrico, già convalidato in bibliografia (Lorenz et al., 2003).

I risultati sono presentati con i valori medi e la deviazione standard (DS). Un'analisi di correlazione lineare Pearson è stata eseguita per valutare il rapporto tra i valori di BE a T80 ed il peso dei soggetti.

VARIABILE	METODO DI VALUTAZIONE	PUNTEGGIO §	INTERPRETAZIONE
Stato del sensorio	Osservazione diretta	0	Normale
		1	Depresso – Sonnolente
		2	Comatoso
Postura	Osservazione diretta	0	Capacità di mantenere la stazione senza aiuto
		2	Incapacità di mantenere la stazione senza aiuto
Andatura	Osservazione diretta Stimolazione manuale con movimenti laterali	0	Coordinata
		1	Lievemente incoordinata
		2	Fortemente incoordinata
Riflesso della suzione	Dito indice nella bocca	0	Forte suzione ben coordinata
		1	Suzione debole coordinata
		2	Masticamento disorganizzato
		3	Assente
Riflesso palpebrale	Sfioramento del canto mediale o laterale dell'occhio	0	Forte riflesso istantaneo
		1	Riflesso rallentato
		2	Riflesso assente
Risposta alla minaccia	Movimento della mano verso l'occhio	0	Forte risposta istantanea
		1	Risposta rallentata
		2	Risposta assente

Tab. 1 Sistema di punteggio numerico per la valutazione dello stato clinico dei vitelli (modificato da Kasari, 1999).

§ il punteggio minimo di un animale sano risulta uguale a zero mentre il punteggio massimo è pari a 13 per un animale fortemente colpito.

2.2 RISULTATI

L'infusione di 4000 ml di una soluzione di acido cloridrico 0,1 M ha indotto acidosi sistemica in tutti i vitelli. La tabella 2 mostra i valori singoli con media e deviazione standard di BE e quindi di conseguenza l'andamento dello stato acidotico. I valori medi di BE partono da 4,0 mmol/L \pm 2,3 mmol/L per raggiungere i valori più bassi (-22,5 mmol/L \pm 5,1 mmol/L) al termine degli 80 minuti di infusione programmati (Fig. 4). Il range di valori così ampio è stato attribuito alla notevole differenza di peso tra i vitelli (correlazione negativa tra il peso dei soggetti ed il valore di BE a T80, $p < 0,05$; $r = 0,534$).

Valori di BE prima (T0), durante (80 minuti) e al termine dell'infusione di 4000 ml di una soluzione di HCl 0,1M(50 ml/min) (mmol/l)																
	T 0	20	40	60	80	Minuti										
						90	100	110	120	130	140	150	180	210	270	390
Vit.																
113	4,8	-2,5	-8,9	-13,4	-17,0	-14,8	-13,8	-12,8	-12,2	-11,8	-11,9	-11,2	-10,4	-8,9	-7,3	-6,5
111	2,0	-5,7	-9,9	-14,1	-18,1	-15,5	-14,3	-13,8	-12,9	-12,6	-12,8	-11,8	-10,5	-9,3	-8,3	-6,5
114	2,9	-4,9	-10,5	-15,0	-18,9	-17,2	-14,9	-14,2	-13,6	-13,1	-12,8	-12,9	-11,8	-12,0	-10,0	-6,8
112	2,6	-5,4	-11,9	-16,9	-21,0	-18,6	-17,3	-16,6	-16,0	-15,3	-14,7	-14,1	-12,9	-12,0	-11,0	-9,3
117	1,3	-10,0	-14,9	-20,2	-25,1	-21,9	-20,9	-19,8	-19,0	-18,8	-18,5	-18,4	-17,1	-15,0	-12,0	-9,2
143	2,9	-4,6	-10,5	-15,1	-19,3	-17,4	-16,1	-14,3	-13,8	-13,4	-12,9	-12,2	-11,5	-10,9	-8,7	-5,8
144	4,7	-8,8	-16,1	-22,4	-27,6	-24,2	-21,8	-20,2	-19,1	-18,4	-18,0	-17,1	-15,8	-13,6	-12,4	-11,4
142	5,3	-8,4	-17,6	-26,1	-33,1	-30,6	-26,4	-24,6	-23,0	-21,7	-20,8	-20,1	-18,9	-17,7	-14,3	-10,3
145	4,4	-7,9	-15,1	-22,1	-29,4	-24,2	-22,9	-20,4	-19,4	-18,6	-17,6	-17,2	-15,4	-13,3	-11,9	-8,2
146	-1,6	-11,3	-17,2	-22,2	-26,3	-23,5	-21,2	-21,0	-19,9	-19,0	-17,9	-17,4	-18,3	-15,7	-13,3	-10,7
149	4,6	-2,1	-8,2	-14,8	-17,7	-16,6	-14,5	-12,3	-11,1	-10,3	-9,1	-8,4	-7,9	-6,8	-6,6	-5,5
150	4,7	-5,1	-10,2	-15,3	-20,4	-17,7	-16,4	-15,1	-14,6	-13,8	-12,7	-12,4	-10,7	-9,6	-9,0	-8,3
151	6,5	-0,7	-6,7	-12,0	-17,0	-14,3	-13,0	-13,6	-11,6	-11,9	-11,2	-10,8	-10,3	-9,0	-8,2	-4,7
152	7,4	-4,0	-9,2	-15,8	-21,2	-17,3	-17,2	-14,8	-13,9	-13,7	-12,5	-12,3	-11,7	-10,2	-9,1	-9,6
153	6,2	-3,9	-11,7	-18,2	-24,3	-22,6	-20,6	-18,3	-17,6	-16,9	-16,3	-15,6	-14,3	-12,3	-10,4	-7,5
Media	3,9	-5,7	-11,9	-17,6	-22,4	-19,8	-18,1	-16,8	-15,8	-15,3	-14,6	-14,1	-13,2	-11,7	-10,2	-8,0
DS	2,9	3,0	3,4	4,1	4,9	4,5	3,9	3,7	3,6	3,4	3,3	3,3	3,3	2,9	2,3	2,0

Tab. 2 Andamento della cloremia in tutti i soggetti durante il periodo di osservazione

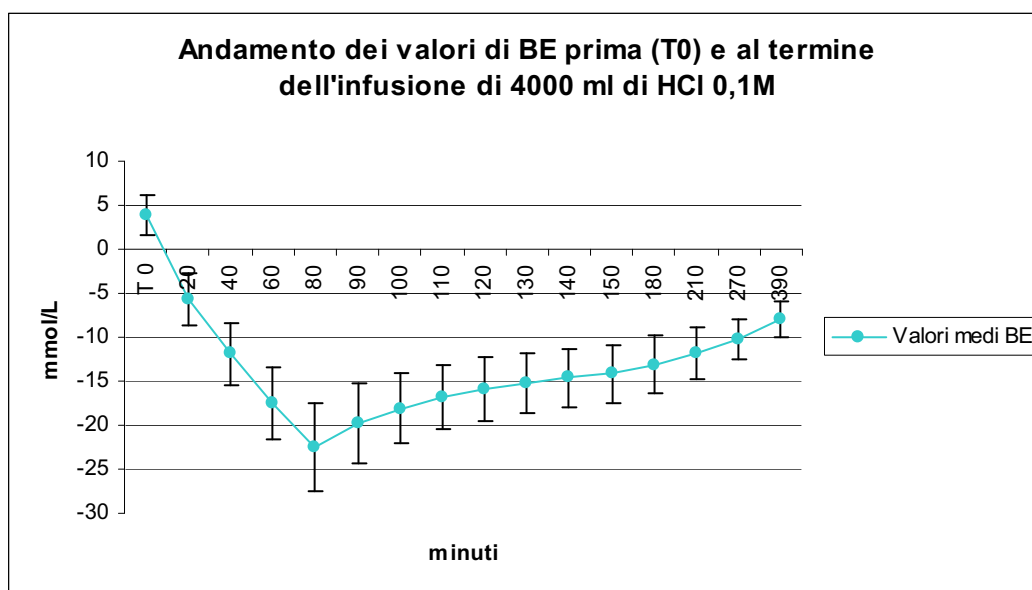


Fig. 4 Andamento delle medie dei valori di BE nel periodo di osservazione

A fronte di un'acidosi metabolica relativamente grave, tutti i vitelli sono risultati completamente sani durante tutto il periodo di osservazione (T0-T390), incluso il vitello con valori di BE pari a -33,1 mmol/L. Dopo aver lasciato liberi gli animali dalla contenzione necessaria per la somministrazione endovenosa, tutti i vitelli hanno ricevuto un punteggio dello stato clinico pari a zero ed hanno anche dimostrato un buon appetito, cercando il secchio del latte ricostituito e suggendolo velocemente e vigorosamente. Le figure 5, 6 e 7 mostrano l'inaspettato atteggiamento "sano" di tre vitelli con valori di BE pari a -33,1, -26,3 e -27,6 mmol/L rispettivamente, subito dopo il termine della somministrazione di acido cloridrico.

È stata, inoltre, osservata poliuria, anche se non quantificata con la raccolta totale delle urine, in tutti i soggetti, come conseguenza dell'ipervolemia indotta.

Per ciò che riguarda il bilancio elettrolitico, il disturbo dell'equilibrio acido-base è accompagnato da un aumento della cloremia (Tab. 3) mentre le concentrazioni ematiche di sodio e potassio sono sempre rimaste nei limiti fisiologici, quest'ultimo indicativo di un mancato shift cationico a fronte di un incremento di idrogenioni extracellulari (Tab. 4). Inoltre, è stato osservato un incremento del calcio ionico ematico (Tab. 5).

Cl- prima (T0), durante (80 minuti) e al termine dell'infusione di 4000 ml di una soluzione di HCl 0,1M(50 ml/min) (mmol/l)																
	Minuti															
	T 0	20	40	60	80	90	100	110	120	130	140	150	180	210	270	390
Vit																
113	95	104	109	114	116	114	114	114	113	112	112	112	110	111	111	110
111	103	110	114	118	121	120	120	119	119	119	118	118	116	115	116	112
114	101	107	112	119	123	119	118	118	119	117	116	116	115	114	114	112
112*																
117	99	108	114	118	122	120	121	119	118	118	117	117	116	116	114	109
143	100	109	114	117	122	120	119	118	118	118	118	117	117	115	112	110
144	97	111	116	122	125	122	122	120	120	118	119	119	117	114	113	115
142	101	116	122	129	133	130	130	127	126	125	124	124	123	122	120	114
145	102	112	119	125	129	127	126	125	124	123	122	122	120	117	116	113
146	104	113	119	123	127	124	126	124	122	121	121	121	120	118	117	116
149	97	103	109	115	119	116	115	114	113	112	112	112	113	111	110	107
150	100	104	111	117	119	120	118	117	116	116	116	116	116	114	113	113
151	95	104	112	116	120	119	117	117	116	115	116	115	116	113	110	110
152	92	106	111	117	122	121	119	118	117	116	117	116	116	112	110	110
153	93	106	112	119	124	121	120	119	119	118	118	117	116	115	111	109
Media	98	108	113	119	123	120	120	119	118	117	117	117	116	114	113	111
DS	3,74	3,93	3,90	4,15	4,42	4,05	4,43	3,79	3,69	3,65	3,34	3,41	3,11	2,91	3,03	2,56

Tab. 3 Andamento della cloremia in tutti i soggetti durante il periodo di osservazione

* Dati mancanti

K⁺ prima (T0), durante (80 minuti) e al termine dell'infusione di 4000 ml di una soluzione di HCl 0,1M(50 ml/min) (mmol/l)																
	Minuti															
	T 0	20	40	60	80	90	100	110	120	130	140	150	180	210	270	390
Vit																
113	4,2	4,5	3,9	3,9	4,2	4,2	4,1	4,4	4,3	4,3	4,7	4,6	4,3	4,2	4,7	4,3
111	4,4	3,9	4	3,9	4,1	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,1	4,1	4,4	4,6	4,3	4,6
114	4,6	3,9	3,8	4,0	4,2	4,3	4,4	4,3	4,4	4,1	4,2	4,3	4,3	4,3	4,1	4,5
112*																
117	4,1	4,0	3,7	4,0	4,3	4,5	5,0	4,6	4,4	4,4	4,1	4,1	4,1	4,2	4,2	4,3
143	4,0	3,9	3,9	3,9	4,0	4,1	4,0	4,3	4,1	4,1	4,0	4,1	4,1	4,1	4,1	4,9
144	4,6	3,9	3,7	3,9	3,9	4,5	4,7	4,4	4,4	4,2	4,2	4,7	4,5	4,7	4,3	4,2
142	4,3	3,8	3,7	4,1	4,4	5,4	5,5	5,2	5,5	5,2	5,0	4,8	4,5	4,4	4,1	5,0
145	4,5	4,1	4,6	4,9	4,3	4,9	5,1	5,2	4,8	4,7	4,8	5,0	4,4	4,5	4,2	4,8
146	4,1	3,8	3,7	3,6	3,8	4,4	4,9	4,4	4,2	4,2	4,2	4,1	4,5	4,4	4,0	4,2
149	4,6	4,1	4,1	4,1	4,1	4,4	4,6	4,4	4,3	4,0	4,1	4,0	4,0	4,2	4,1	4,1
150	4,8	4,0	3,7	3,8	4,0	4,8	4,6	4,6	4,1	4,2	4,3	4,3	4,2	4,1	4,2	4,0
151	5,2	4,8	4,5	4,5	4,6	5,0	5,2	5,3	5,2	4,9	4,9	4,9	4,8	4,9	5,2	4,7
152	4,6	4,6	4,5	4,5	4,7	5,6	5,2	4,8	4,7	4,5	4,3	4,1	3,9	4,3	4,3	4,2
153	4,0	3,9	3,9	4,4	4,9	4,9	5,3	5,4	4,8	4,5	4,4	4,3	4,5	4,6	4,5	4,1
Media	4,43	4,09	3,98	4,11	4,25	4,66	4,77	4,68	4,53	4,39	4,38	4,39	4,32	4,39	4,31	4,42
DS	0,34	0,32	0,33	0,35	0,31	0,46	0,47	0,42	0,42	0,34	0,33	0,34	0,24	0,24	0,31	0,33

Tab. 4 Andamento della potassiemia in tutti i soggetti durante il periodo di osservazione

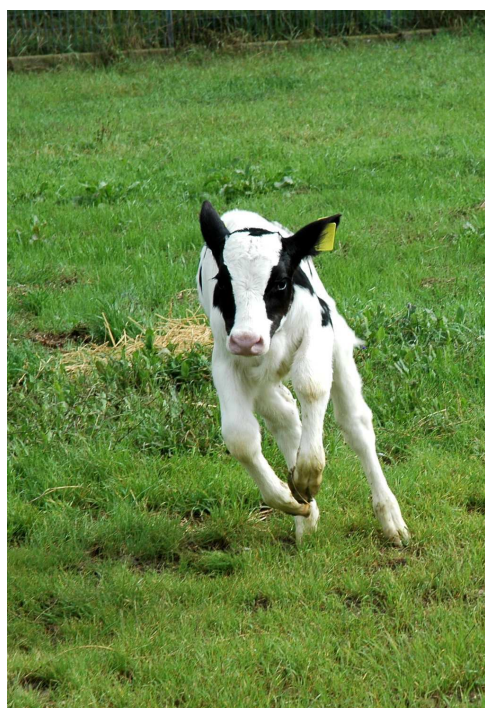


Fig. 5 Vitello 142 dopo il prelievo a T80 con BE di -33,1 mmol/L



Fig. 6 Vitello 146 dopo il prelievo a T80 con BE di -26,3 mmol/L



Fig. 7 Vitello 145 dopo il prelievo a T80 con BE di -29,4 mmol/L

Calcemia prima (T0), durante (80 minuti) e al termine dell'infusione di 4000 ml di una soluzione di HCl 0,1M(50 ml/min) (mmol/l)																
	Minuti															
	T 0	20	40	60	80	90	100	110	120	130	140	150	180	210	270	390
Vit																
113	1,2	1,2	1,3	1,4	1,6	1,5	1,5	1,6	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,3
111	1,2	1,2	1,4	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6	1,5	1,6	1,6	1,4	1,3	1,4
114	1,4	1,3	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,6	1,6	1,7	1,6	1,6	1,5	1,6	1,4	1,4
112[♦]																
117	1,3	1,3	1,3	1,4	1,8	1,5	1,7	1,7	1,7	1,6	1,6	1,7	1,7	1,5	1,5	1,4
143	1,1	1,2	1,4	1,4	1,5	1,5	1,2	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,3	1,3	1,4	1,3
144	1,2	1,2	1,2	1,6	1,5	1,4	1,5	1,5	1,6	1,3	1,5	1,5	1,5	1,3	1,2	1,2
142	1,3	1,3	1,3	1,5	1,6	1,6	1,9	1,8	1,7	1,7	1,8	1,7	1,5	1,6	1,4	1,3
145	1,2	1,2	1,4	1,5	1,4	1,6	1,6	1,7	1,5	1,5	1,5	1,6	1,4	1,4	1,2	1,3
146	1,2	1,1	1,4	1,4	1,6	1,4	1,6	1,5	1,4	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4
149	1,2	1,1	1,3	1,4	1,4	1,3	1,5	1,4	1,5	1,3	1,5	1,4	1,4	1,4	1,3	1,2
150	1,2	1,1	1,3	1,5	1,1	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4	1,4	1,4	1,5	1,4	1,5	1,4
151	1,3	1,3	1,5	1,7	1,8	1,6	1,8	1,8	1,7	1,6	1,8	1,8	1,6	1,7	1,6	1,5
152	1,1	1,4	1,5	1,5	1,7	1,8	1,6	1,7	1,6	1,5	1,7	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5
153	1,1	1,4	1,6	1,8	1,8	1,7	1,9	2,0	1,9	1,8	1,7	1,7	1,7	1,8	1,6	1,6
Media	1,2	1,2	1,4	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,6	1,5	1,6	1,6	1,5	1,5	1,4	1,4
DS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Tab. 5 Andamento della calcemia in tutti i soggetti durante il periodo di osservazione

La condizione di acidosi metabolica ipercloremica pura, senza addizione di acidi organici, è stata confermata dalla determinazione del disavanzo anionico, che non si è mai discostato dai limiti fisiologici.

Le concentrazioni di L- e D-lattato sono sempre rimaste nei limiti della norma.

SECONDA PROVA SPERIMENTALE

INDUZIONE DI IPER L-LATTACIDEMIA

3.1 PRIMA PARTE

3.1.1 MATERIALI E METODI

Per questa prova è stato eseguito uno studio pilota su 5 vitelli sani di razza Frisona stabulati liberamente su una lettiera di paglia ed alimentati con latte ricostituito, somministrato attraverso un secchio con tettarella, tre volte al giorno: alle ore 8:00, 13:00 e 18:00. La loro età al momento dell'inizio della prova variava tra i 3 e i 10 giorni ($6,8 \pm 2,7$ giorni) ed il loro peso tra 42,3 e 56,4 kg ($50,2 \pm 6,1$ kg).

I vitelli sono stati fatti ambientare alla nuova stabulazione per almeno un paio di giorni e durante questo periodo tutti i soggetti presentavano appetito e feci nella norma.

Il giorno della sperimentazione, dopo la somministrazione della razione delle ore 8:00, sono stati applicati due cateteri endovenosi (FEP radio-opaco, non pirogeno, 14G [2,0 x 70 mm]; Delta Med Medical Services) in entrambe le vene giugulari. Il sito di inserzione è stato precedentemente rasato e disinfettato per un'applicazione sterile del catetere. Inoltre è stata applicata una sacca per urostomia umana (Urodress, Convatec, Bristol-Myers Squibb Company) attorno al prepuzio, previa rasatura della parte, per la raccolta continua delle urine. Ogni giorno sono stati scelti due vitelli casualmente ed utilizzati

contemporaneamente, iniettando ad un soggetto una soluzione di L-lattato al 25% ed all'altro una pari quantità di soluzione fisiologica NaCl 0,9%. Una volta utilizzato per la somministrazione di L-lattato, il vitello è stato escluso dalle prove successive.

L'iper L-lattacidemia è stata indotta attraverso l'infusione endovenosa di un bolo di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (per un totale di 223,1 mmol/L) per un periodo variabile tra i 60 e i 70 secondi. La soluzione è stata preparata aggiungendo 25 gr di L-lattato sodico a 100 ml di acqua per preparazioni iniettabili ed è stata inoculata monolateralmente, dopo averla intiepidita.

La vena giugulare controlaterale è stata utilizzata per raccogliere campioni di sangue prima dell'inoculazione (T0), dopo 2,5 minuti (T2,5), poi ad intervalli di 5 minuti durante il periodo di infusione (T5, T10, T15, T20, T25, T30, T35) ed in seguito agli stessi intervalli dopo il termine della somministrazione: T40, T45, T50, T55, T60, T65. Il catetere endovenoso utilizzato per prelevare i campioni è stato pulito tramite aspirazione e reiniezione di sangue per 30 secondi prima di ogni campionamento.

Le condizioni cliniche sono state valutate prima dell'inizio della prova, a brevi intervalli durante e al termine dell'inoculazione ed il periodo di osservazione continuo è stato protratto fino all'ultimo prelievo di sangue (T65). Attenzione particolare è stata rivolta alle variazioni della postura, stato del sensorio e ai riflessi palpebrale e della suzione, secondo lo schema illustrato in tabella 1.

Ai tempi T0, T30 e T45 sono stati prelevati anche campioni di sangue eparinizzato, su cui è stata eseguita, immediatamente dopo il prelievo, un'emogasanalisi (ABL 700, Radiometer, Copenhagen, Danimarca) per valutare potenziali variazioni dell'equilibrio acido-base. Sono stati determinati i seguenti parametri: pH, pCO₂, bicarbonato di sodio (HCO₃⁻), base eccesso (BE).

Sul medesimo campione sono state valutate le concentrazioni di sodio (Na⁺), potassio (K⁺) e cloro (Cl⁻). Il valore di disavanzo anionico è stato calcolato nel modo seguente: $[(Na^+) + (K^+)] - [(Cl^-) + (HCO_3^-)]$.

Le concentrazioni di D- e L-lattato sono state determinate sia sul plasma di campioni raccolti in provette contenenti un anticoagulante glucostatico, EDTA-KF, e centrifugate immediatamente, sia sulle urine raccolte a T120, T240 e T1440.

Il plasma e le urine sono state conservate a -20°C fino al momento dell'analisi, eseguita con metodo spettrofotometrico, già convalidato in bibliografia (Lorenz et al., 2003).

I risultati sono presentati con i valori medi e la deviazione standard (DS). Un'analisi di correlazione lineare Pearson è stata eseguita per valutare il rapporto tra l'andamento dei valori di BE e quello dei valori di potassiemia ed anche per valutare il rapporto tra i valori di L-lattato a T2,5 ed il peso dei soggetti.

3.1.2 RISULTATI

L'infusione di 100 ml di una soluzione di L-lattato al 25% non ha indotto un incremento duraturo della L-lattacidemia in tutti i vitelli. La tabella 6 mostra i valori singoli con media e deviazione standard dell'L-lattacidemia; questi partono da 1,0 mmol/L \pm 0,5 mmol/L per raggiungere i valori più elevati (13,1 mmol/L \pm 1,7 mmol/L) dopo circa 90 secondi dal termine dell'infusione endovenosa (T2,5). Accanto all'incremento di questo anione è stato osservato, seppur supportato da pochi prelievi, un incremento del valore di BE (Tab. 7). Il range di valori di L-lattato a T2,5 non risulta molto ampio ed infatti, correlandolo con i pesi dei soggetti, non è risultata alcuna differenza significativa (nessuna correlazione tra il peso dei soggetti ed il valore di L-lattato a T2,5, $p > 0,05$; $r = 0,370$).

Concentrazione di L-lattato prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
2	1,3	15,4	13,1	10,7	10,1	9,2	6,0	4,6	3,2	2,4	2,0	1,6	1,3	1,4	1,0
4	1,3	13,9	10,1	8,7	7,8	7,0	4,6	3,2	2,0	1,6	1,4	1,0	1,0	1,1	1,0
1	0,8	11,2	9,2	7,9	6,8	6,1	3,4	2,2	1,7	1,1	0,9	0,9	0,8	0,8	0,7
3	0,8	13,2	9,8	8,3	7,6	6,9	4,3	2,9	2,0	1,4	1,3	0,8	1,1	0,9	1,0
11	1,0	11,9	9,9	8,7	7,9	7,5	5,3	3,9	3,2	2,9	2,5	2,0	1,8	1,4	1,0
Media	1,0	13,1	10,4	8,9	8,0	7,3	4,7	3,4	2,4	1,9	1,6	1,3	1,2	1,1	0,9
DS	0,25	1,66	1,54	1,08	1,23	1,15	0,99	0,92	0,72	0,75	0,63	0,52	0,38	0,28	0,13

Tab. 6 Andamento della L-lattatemia in tutti i soggetti durante il periodo di osservazione

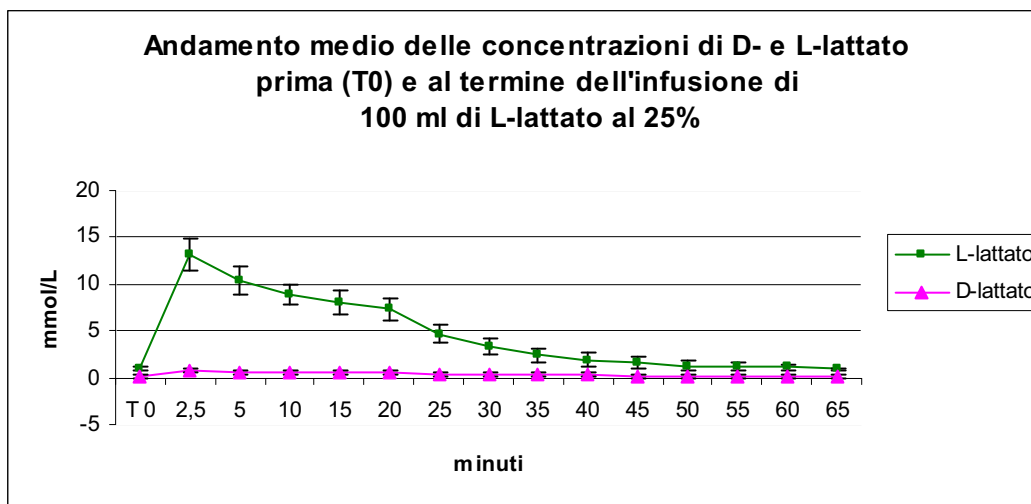


Fig. 8 Confronto tra l'andamento delle medie dei valori di L-lattatemia e quello delle medie di D-lattatemia nel periodo di osservazione

		Valori di BE prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)														
		Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	
Vit																
2	3,3							9,1			9,9					
4	5,7							10,8			11,0					
1	2,3							10,3			10,6					
3	4,2							9,4			9,1					
11	4,1							8,9			9,9					
Media	3,9							9,7			10,1					
DS	1,25							0,82			0,73					

Tab. 7 Andamento dei valori di BE in tutti i soggetti durante il periodo di osservazione

A fronte di una seppur modica alcalosi metabolica, tutti i vitelli sono risultati completamente sani durante tutto il periodo di osservazione (T0-T65). Dopo aver lasciato liberi gli animali dalla contenzione necessaria per la somministrazione endovenosa, tutti i vitelli hanno ricevuto un punteggio dello

stato clinico pari a zero. Al termine del periodo di osservazione è stato offerto loro 1,5 L di latte ricostituito, che tutti i soggetti hanno mangiato velocemente e avidamente.

Per ciò che riguarda il bilancio elettrolitico, il disturbo dell'equilibrio acido-base è accompagnato da un decremento della potassiemia (Tab. 8) mentre le concentrazioni ematiche di cloro, sodio e calcio sono sempre rimaste nei limiti fisiologici. Dalla raccolta della urine nelle 24 ore di osservazione, infine, non è stata osservata poliuria (produzione media di urina 2,26 ml/kg/h). La relazione tra l'andamento dei valori di BE e la potassiemia segue una correlazione lineare negativa ed all'incremento del primo segue un decremento del secondo (correlazione negativa tra i valori di BE nel periodo di osservazione e la potassiemia, $p < 0,01$; $r = 0,988$).

Potassiemia prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
2	4,2							3,7			3,5				
4	4,2							3,7			3,4				
1	3,8							3,4			3,6				
3	4,1							3,6			3,4				
11	4,1							3,5			3,3				
Media	4,08							3,58			3,44				
DS	0,16							0,13			0,11				

Tab. 8 Andamento della potassiemia in tutti i soggetti durante il periodo di osservazione

3.2 SECONDA PARTE

3.2.1 MATERIALI E METODI

In questa prova sono stati utilizzati 4 vitelli sani di razza Frisona stabulati liberamente su una lettiera di paglia ed alimentati con latte ricostituito, somministrato attraverso un secchio con tettarella, tre volte al giorno: alle ore 8:00, 13:00 e 18:00. La loro età al momento dell'inizio della prova variava tra i 4 e i 20 giorni ($14,7 \pm 7,5$ giorni) ed il loro peso tra 30,8 e 55,2 kg ($44,9 \pm 10,3$ kg). I vitelli sono stati fatti ambientare alla nuova stabulazione per almeno un paio di giorni e durante questo periodo tutti i soggetti presentavano appetito e feci nella norma.

Il giorno della sperimentazione, dopo la somministrazione della razione delle ore 8:00, sono stati applicati due cateteri endovenosi (FEP radio-opaco, non pirogeno, 14G [2,0 x 70 mm]; Delta Med Medical Services) in entrambe le vene giugulari. Il sito di inserzione è stato precedentemente rasato e disinfettato per un'applicazione sterile del catetere. Ogni giorno sono stati scelti due vitelli casualmente ed utilizzati contemporaneamente, iniettando ad un soggetto una soluzione di L-lattato al 25% ed all'altro una pari quantità di soluzione fisiologica NaCl 0,9%. Una volta utilizzato per la somministrazione di L-lattato, il vitello è stato escluso dalle prove successive.

L'iper L-lattacidemia è stata indotta attraverso l'infusione endovenosa di 400 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (per un totale di 892,4 mmol/L) per un periodo di 37,5 minuti, suddiviso in un bolo iniziale di 100 ml in 60 secondi

seguito da un'infusione di 300 ml ad una velocità di 10 ml/min. La soluzione è stata preparata aggiungendo 100 gr di L-lattato sodico a 400 ml di acqua per preparazioni iniettabili ed è stata iniettata monolateralmente, dopo averla intiepidita. La vena giugulare controlaterale è stata utilizzata per raccogliere campioni di sangue prima dell'inoculazione (T0), dopo 2,5 minuti di iniezione (T2,5), poi ad intervalli di 5 minuti durante il periodo di infusione (T5, T10, T15, T20, T25, T30, T35) ed in seguito agli stessi intervalli dopo il termine della somministrazione: T40, T45, T50, T55, T60, T65.

Il catetere endovenoso utilizzato per prelevare i campioni è stato pulito tramite aspirazione e reiniezione di sangue per 30 secondi prima di ogni campionamento.

Le condizioni cliniche sono state valutate prima dell'inizio della prova, a brevi intervalli durante e al termine dell'inoculazione ed il periodo di osservazione è stato protratto fino all'ultimo prelievo di sangue (T65). Attenzione particolare è stata rivolta alle variazioni della postura, stato del sensorio e ai riflessi palpebrale e della suzione, secondo lo schema illustrato in tabella 1. Immediatamente dopo il termine della somministrazione, i vitelli sono stati liberati dalla contenzione alla cavezza e sono stati lasciati muovere liberamente. In seguito è stato loro offerto il pasto, 1,5 L di latte ricostituito, attraverso un secchio con tettarella.

Stato del sensorio, andatura, appetito e quantità di latte assunto sono stati registrati.

Su campioni di sangue eparinizzato, immediatamente dopo il prelievo, è stata eseguita un'emogasanalisi (ABL 700, Radiometer, Copenhagen, Danimarca) per valutare eventuali variazioni dell'equilibrio acido-base. Sono stati determinati i seguenti parametri: pH, pCO₂, bicarbonato di sodio (HCO₃⁻), base eccesso (BE). Sul medesimo campione sono state valutate le concentrazioni di sodio (Na⁺), potassio (K⁺) e cloro (Cl⁻).

Il valore di disavanzo anionico è stato calcolato nel modo seguente:

$$[(\text{Na}^+) + (\text{K}^+)] - [(\text{Cl}^-) + (\text{HCO}_3^-)].$$

Le concentrazioni di L- e D-lattato sono state determinate sul plasma di campioni raccolti in provette contenenti un anticoagulante glucostatico, EDTA-KF, e centrifugate immediatamente.

Il plasma è stato conservato a -20°C fino al momento dell'analisi, eseguita con metodo spettrofotometrico, già convalidato in bibliografia (Lorenz et al., 2003).

I risultati sono presentati con i valori medi e la deviazione standard (DS). Un'analisi di correlazione lineare Pearson è stata eseguita per valutare il rapporto tra l'andamento dei valori di BE e quello dei valori di potassiemia ed anche per valutare il rapporto tra i valori di L-lattato a T35 ed il peso dei soggetti.

3.2.2 RISULTATI

L'infusione di 400 ml di una soluzione di L-lattato al 25% ha indotto un incremento significativo della L-lattacidemia in tutti i vitelli dal T2,5 che persiste per tutto il periodo di osservazione. La tabella 9 mostra il valori singoli con media e deviazione standard dell'L-lattacidemia; questi partono da 1,2 mmol/L \pm 0,5 mmol/L per raggiungere i valori più elevati (25,0 mmol/L \pm 8,9 mmol/L) al termine della somministrazione endovenosa (T35).

Accanto all'incremento di questo anione è stato confermato, come osservato nella prova preliminare, un incremento significativo del valore di BE con valori massimi (19,7 mmol/L \pm 0,8 mmol/L) al termine del periodo di osservazione (T65) (Tab. 10). Il range di valori di L-lattato così ampio è stato attribuito alla notevole differenza di peso tra i vitelli (correlazione negativa tra il peso dei soggetti ed il valore di L-lattato a T35, $p < 0,05$; $r = 0,954$).

Concentrazione di L-lattato prima (T0) e al termine dell'infusione di 400 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto e seguente infusione di 300 ml per 35 minuti) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
28	1,9	10,4	9,1	13,6	15,1	17,7	19,3	20,5	21,6	20,4	18,6	16,4	14,8	13,3	12,0
24	1,0	10,5	9,1	14,6	12,6	18,2	20,1	21,2	18,8	20,0	16,2	14,5	13,1	12,0	10,4
23	0,9	13,1	9,0	13,4	13,8	17,1	18,7	20,1	21,4	22,0	17,3	16,5	13,7	9,8	9,1
25	1,0	16,2	14,3	19,3	21,7	24,7	31,2	35,7	38,3	36,5	33,2	24,2	22,4	22,1	20,3
Media	1,2	12,6	10,4	15,2	15,8	19,4	22,3	24,4	25,0	24,7	21,3	17,9	16,0	14,3	13,0
DS	0,47	2,74	2,62	2,77	4,06	3,55	5,94	7,56	8,94	7,90	7,98	4,30	4,32	5,40	5,04

Tab. 9 Andamento della L-lattatemia in tutti i soggetti durante il periodo di osservazione

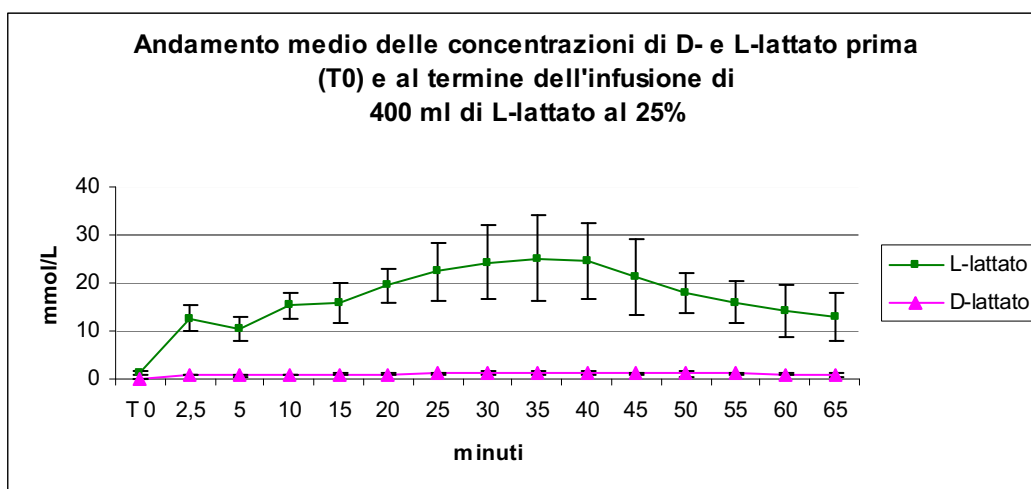


Fig. 9 Confronto tra l'andamento delle medie dei valori di L-lattatemia e quello delle medie di D-lattatemia nel periodo di osservazione

Valori di BE prima (T0) e al termine dell'infusione di 400 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto e seguente infusione di 300 ml per 35 minuti) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
28	4,9	8,7	8,4	10,4	11,1	12,0	12,4	13,8	14,9	16,0	16,4	16,8	17,3	18,6	19,2
24	5,7	8,9	9,3	9,8	10,4	10,4	13,4	14,5	15,2	16,8	18,0	18,5	18,4	19,1	19,3
23	5,7	8,9	9,3	9,8	10,4	10,4	13,4	14,5	15,2	16,8	18,0	18,5	18,4	19,1	19,3
25	6,3	10,3	10,0	11,3	12,3	13,8	14,6	15,6	16,7	16,3	17,9	19,6	19,2	19,9	20,9
Media	5,7	9,2	9,3	10,3	11,1	11,7	13,5	14,6	15,5	16,5	17,6	18,4	18,3	19,2	19,7
DS	0,57	0,74	0,66	0,71	0,90	1,62	0,90	0,74	0,81	0,39	0,78	1,16	0,78	0,54	0,82

Tab. 10 Andamento dei valori di BE in tutti i soggetti durante il periodo di osservazione

A fronte di un'alcalosi metabolica, tutti i vitelli sono risultati completamente sani durante tutto il periodo di osservazione (T0-T65). Dopo aver lasciato liberi gli animali dalla contenzione necessaria per la somministrazione endovenosa, tutti i vitelli hanno ricevuto un punteggio dello stato clinico pari a zero. Al

termine del periodo di osservazione è stato offerto loro 1,5 L di latte ricostituito, che tutti i soggetti hanno mangiato velocemente e avidamente.

Per ciò che riguarda il bilancio elettrolitico questo è sovrapponibile al quadro osservato nella prova preliminare; il disturbo dell'equilibrio acido-base è, infatti, accompagnato da un decremento della potassiemia (Tab. 11) mentre le concentrazioni ematiche di cloro e calcio sono sempre rimaste nei limiti fisiologici. È stata inoltre osservata una lieve ipernatremia con un lieve incremento dell'osmolarità. La relazione tra l'andamento dei valori di BE e la potassiemia segue una correlazione lineare negativa ed all'incremento del primo segue un decremento del secondo (correlazione negativa tra i valori di BE nel periodo di osservazione e la potassiemia, $p < 0,05$; $r = 0,952$).

Potassiemia prima (T0) e al termine dell'infusione di 400 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto e seguente infusione di 300 ml per 35 minuti) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
28	4,1	3,8	3,8	3,9	3,6	3,4	3,3	3,3	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2
24	4,0	3,5	3,4	3,2	3,3	3,0	2,9	2,8	2,8	2,7	2,7	2,9	2,7	2,8	2,8
23	4,0	3,5	3,4	3,2	3,3	3,0	2,9	2,8	2,8	2,7	2,7	2,9	2,7	2,8	2,8
25	4,5	3,9	3,8	3,3	3,1	3,0	3,1	2,8	2,7	2,7	2,7	2,8	2,6	2,6	2,6
Media	4,15	3,68	3,60	3,40	3,33	3,10	3,05	2,93	2,88	2,83	2,83	2,95	2,80	2,85	2,85
DS	0,24	0,21	0,23	0,34	0,21	0,20	0,19	0,25	0,22	0,25	0,25	0,17	0,27	0,25	0,25

Tab. 11 Andamento della potassiemia in tutti i soggetti durante il periodo di osservazione

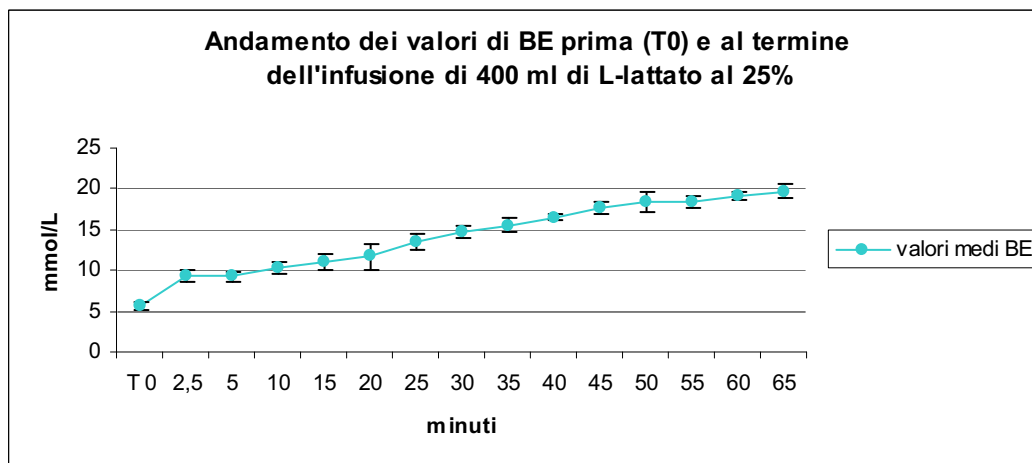


Fig. 10 Andamento delle medie dei valori di BE nel periodo di osservazione

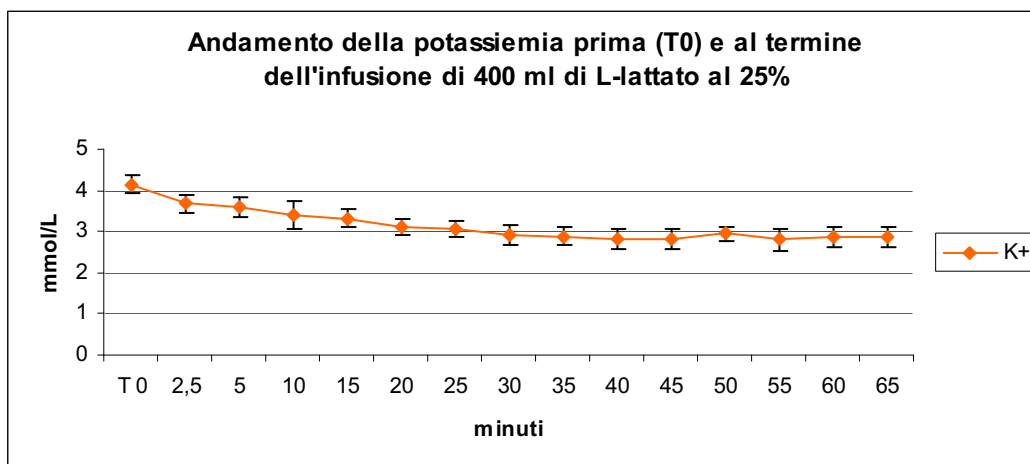


Fig. 11 Andamento delle medie dei valori di potassiemia nel periodo di osservazione

TERZA PROVA SPERIMENTALE

INDUZIONE DI IPER D-LATTACIDEMIA

4.1 MATERIALI E METODI

In questa prova sono stati utilizzati 5 vitelli sani di razza Frisona stabulati liberamente su una lettiera di paglia ed alimentati con latte ricostituito, somministrato attraverso un secchio con tettarella, tre volte al giorno: alle ore 8:00, 13:00 e 18:00. La loro età al momento dell'inizio della prova era inferiore ai 14 giorni ed il loro peso variava tra 36,4 e 47,6 kg ($42,8 \pm 4,1$ kg). I vitelli sono stati fatti ambientare alla nuova stabulazione per almeno un paio di giorni e durante questo periodo tutti i soggetti presentavano appetito e feci nella norma.

Il giorno della sperimentazione, dopo la somministrazione della razione delle ore 8:00, sono stati applicati due cateteri endovenosi (FEP radio-opaco, non pirogeno, 14G [2,0 x 70 mm]; Delta Med Medical Services) in entrambe le vene giugulari. Il sito di inserzione è stato precedentemente rasato e disinfettato per un'applicazione sterile del catetere. Inoltre è stata applicata una sacca per urostomia umana (Urodress, Convatec, Bristol-Myers Squibb Company) attorno al prepuzio, previa rasatura della parte, per la raccolta continua delle urine. Ogni giorno sono stati scelti due vitelli casualmente ed utilizzati contemporaneamente, iniettando ad un soggetto una soluzione di D-lattato al 25% ed all'altro una pari quantità di soluzione fisiologica NaCl 0,9%. Una

volta utilizzato per la somministrazione di D-lattato, il vitello è stato escluso dalle prove successive.

L'iper D-lattacidemia è stata indotta attraverso l'infusione endovenosa di un bolo di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato (per un totale di 223,1 mmol/L) in 60 secondi. La soluzione è stata preparata aggiungendo 25 gr di D-lattato sodico a 100 ml di acqua per preparazioni iniettabili ed è stata iniettata monolateralmente, dopo averla intiepidita. La vena giugulare controlaterale è stata utilizzata per raccogliere campioni di sangue prima dell'inoculazione (T0), poi ad intervalli di 2 minuti (T2, T4, T6, T8, T10), in seguito ad intervalli di 10 minuti (T20, T30, T40, T50, T60, T70, T80, T90) ed infine ad intervalli differenti, T120, T240 e T1440, fino alle 24 ore successive la sperimentazione. Il catetere endovenoso utilizzato per prelevare i campioni è stato pulito tramite aspirazione e reiniezione di sangue per 30 secondi prima di ogni campionamento.

Le condizioni cliniche sono state valutate prima dell'inizio della prova, a brevi intervalli durante e al termine dell'inoculazione e il periodo di osservazione è stato protratto continuativamente fino al prelievo di sangue T240. Attenzione particolare è stata rivolta alle variazioni della postura, stato del sensorio e ai riflessi palpebrale e della suzione, secondo lo schema illustrato in tabella 1. Immediatamente dopo il prelievo a T10, i vitelli sono stati liberati dalla contenzione alla cavezza e sono stati lasciati muovere liberamente. Durante il

periodo di osservazione non è stato offerto loro il pasto ma sono stati offerti 1,5 L di latte ricostituito, attraverso un secchio con tettarella, solo al pasto serale. Stato del sensorio, andatura, appetito e quantità di latte assunto sono stati registrati.

Ai tempi T0 e T30 sono stati prelevati anche campioni di sangue eparinizzato, su cui è stata eseguita, immediatamente dopo il prelievo, un'emogasanalisi (ABL 700, Radiometer, Copenhagen, Danimarca) per valutare potenziali variazioni dell'equilibrio acido-base. Sono stati determinati i seguenti parametri: pH, pCO₂, bicarbonato di sodio (HCO₃⁻), base eccesso (BE). Sul medesimo campione sono state valutate le concentrazioni di sodio (Na⁺), potassio (K⁺) e cloro (Cl⁻).

Il valore di disavanzo anionico è stato calcolato nel modo seguente:

$$[(\text{Na}^+) + (\text{K}^+)] - [(\text{Cl}^-) + (\text{HCO}_3^-)].$$

Le concentrazioni di D- e L-lattato sono state determinate sia sul plasma di campioni raccolti in provette contenenti un anticoagulante glucostatico, EDTA-KF, e centrifugate immediatamente, sia sulle urine raccolte a T120, T240 e T1440. Il plasma e le urine sono state conservate a -20°C fino al momento dell'analisi, eseguita con metodo spettrofotometrico, già convalidato in bibliografia (Lorenz et al., 2003).

I risultati sono presentati con i valori medi e la deviazione standard (DS).

Un'analisi di correlazione lineare Pearson è stata eseguita per valutare il rapporto tra i valori di D-lattato a T2 ed il peso dei soggetti.

4.2 RISULTATI

L'infusione di 100 ml di una soluzione di D-lattato al 25% ha indotto un incremento significativo della D-lattacidemia in tutti i vitelli, osservabile sin dal primo prelievo dopo il termine della somministrazione, raggiungendo valori medi di $16,4 \text{ mmol/L} \pm 1,98 \text{ mmol/L}$. La tabella 13 mostra il valori singoli con media e deviazione standard dell'D-lattacidemia; questi partono da $0,1 \text{ mmol/L} \pm 0,07 \text{ mmol/L}$ per raggiungere i valori più elevati ($16,4 \text{ mmol/L} \pm 1,98 \text{ mmol/L}$) al termine della somministrazione endovenosa (T2). Dopo di che è stato osservato un decremento della D-lattacidemia sino ai valori pre-somministrazione.

Il range di valori di D-lattato così ampio è stato attribuito alla notevole differenza di peso tra i vitelli (correlazione negativa tra il peso dei soggetti ed il valore di D-lattato a T2, $p < 0,05$; $r = 0,934$).

Accanto all'incremento di questo anione non è stato osservata alcuna alterazione dei valori di BE (Tab. 14), mentre è stato osservato un modico incremento dei valori di disavanzo anionico, con valori massimi medi di $23,8 \text{ mmol/L} \pm 3,2 \text{ mmol/L}$ (Tab.15).

Concentrazione di D-lattato prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)																	
Vit	T0	Minuti															
		2	4	6	8	10	20	30	40	50	60	70	80	90	120	240	1440
2	0,1	18,7	16,4	14,8	14,2	13,7	10,9	10,6	10,0	9,5	9,2	9,1	8,6	8,0	7,4	5,8	0,3
4	0,1	16,4	13,1	12,6	12,4	11,5	9,8	8,8	8,7	8,4	7,9	8,1	8,2	7,7	7,3	6,3	1,6
7	0,1	17,9	14,4	13,7	12,0	11,5	9,7	8,5	8,1	7,5	6,5	6,3	5,9	6,2	6,0	4,6	0,4
9	0,0	13,8	11,3	11,1	10,7	9,67	9,5	8,8	7,9	8,1	7,5	7,3	7,1	7,1	6,6	5,4	0,5
8	0,2	15,2	12,4	11,2	10,3	9,39	7,9	7,9	7,7	7,1	7,3	6,8	6,7	6,4	6,71	5,2	0,8
Media	0,1	16,4	13,5	12,7	11,9	11,1	9,6	8,9	8,5	8,1	7,7	7,5	7,3	7,01	6,8	5,5	0,7
DS	0,07	1,98	1,95	1,58	1,54	1,73	1,04	1,02	0,93	0,91	0,9	1,09	1,09	0,79	0,56	0,65	0,51

Tab. 13 Andamento della D-lattatemia in tutti i soggetti durante il periodo di osservazione

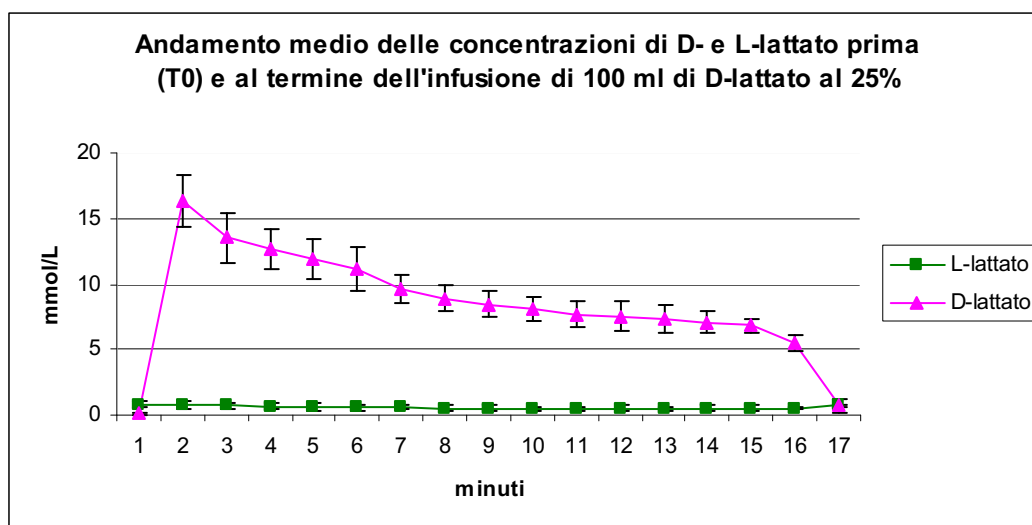


Fig. 12 Confronto tra l'andamento delle medie dei valori di L-lattatemia e quello delle medie di D-lattatemia nel periodo di osservazione

Valori di BE prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)																	
	T0	Minuti															
		2	4	6	8	10	20	30	40	50	60	70	80	90	120	240	1440
Vit																	
2	4,5							6,8									
4	4,2							4,7									
7	3,6							4,0									
9	2,9							3,3									
8	2,3							2,5									
Media	3,5							4,3									
DS	0,90							1,60									

Tab. 14 Andamento dei valori di BE in tutti i soggetti durante il periodo di osservazione

Disavanzo anionico prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)																	
	T0	Minuti															
		2	4	6	8	10	20	30	40	50	60	70	80	90	120	240	1440
Vit																	
2	17,0							26,2									
4	20,3							23,0									
7	16,1							25,2									
9	20,0							25,9									
8	17,3							18,5									
Media	18,1							23,3									
DS	1,90							3,20									

Tab. 15 Andamento dei valori di disavanzo anionico in tutti i soggetti durante il periodo di osservazione

A fronte di un equilibrio acido-base nella norma, tutti i vitelli hanno mostrato un'alterazione dello stato clinico tra T8 e T40 raggiungendo un punteggio clinico di 7 (Tab.16), con alterazioni ricorrenti in ogni soggetto, in particolare sono stati osservati sonnolenza, debolezza, barcollamenti e prolungati periodi di decubito, postura anomala con alterazione della posizione degli arti, riduzione del riflesso palpebrale, testa abbassata, talvolta con dondolamenti, ed orecchie abbassate. I vitelli sono stati osservati spesso e per molto tempo in decubito ed è stato necessario aiutarli affinché assumessero la stazione quadrupedale. Dopo 4 ore, però, tutti i soggetti sono risultati nuovamente clinicamente sani, con punteggio clinico pari a zero, secondo lo schema della tabella 1.

Per ciò che riguarda il bilancio elettrolitico questo ha mostrato solo una lieve ipernatremia con un lieve incremento dell'osmolarità mentre gli altri elettroliti non hanno presentato alterazioni significative né è stata osservata poliuria (produzione media di urina 2,48 ml/kg/h).

VARIABILE	VITELLO	PUNTEGGIO
Stato del sensorio	2	1
	4	1
	7	1
	9	1
	10	1
Postura	2	2
	4	2
	7	2
	9	2
	10	2
Andatura	2	2
	4	2
	7	2
	9	2
	10	2
Riflesso della suzione	2	0
	4	0
	7	0
	9	0
	10	0
Riflesso palpebrale	2	1
	4	1
	7	1
	9	1
	10	1
Risposta alla minaccia	2	1
	4	1
	7	1
	9	1
	10	1

Tab. 16 Andamento dello stato clinico di tutti i soggetti durante nel periodo di osservazione T8-T40 dopo somministrazione di 100 ml di una soluzione di D-lattato al 25%

DISCUSSIONI GENERALI

I risultati presentati nella prima prova sperimentale confermano i numerosi dubbi avanzati in merito all'affidabilità di singoli parametri clinici come indicatori di una stima accurata del grado del disturbo dell'equilibrio acido-base. Questo è confermato dalla dimostrazione che un'acidosi metabolica sperimentalmente indotta, e non complicata, non induce alcuna sintomatologia clinica, almeno nelle nostre condizioni sperimentali, con un'infusione endovenosa di acido cloridrico in vitelli sani.

Il sovraccarico acido totale di 400 mmol per un periodo di 80 minuti, corrispondente a 5 mmol/min, ha, infatti, causato un'acidosi metabolica, il cui grado potrebbe essere definito da medio a grave, se confrontato con l'acidosi metabolica in cui si incorre spontaneamente in corso di diarrea o acidosi ruminale.

Il protocollo di induzione di acidosi idrocloridrica da noi utilizzato ha, quindi, prodotto un'acidosi ipercloremica senza alcuna alterazione elettrolitica, in particolare di sodio e potassio. Come evidenziato da una mancata alterazione dei valori di disavanzo anionico, il disturbo dell'equilibrio acido-base non è stato accompagnato da incremento di acidi organici, come comunemente si osserva in animali affetti da diarrea o acidosi ruminale spontanee.

La mancanza di una risposta iperpotassiemica nella nostra prova sperimentale potrebbe essere spiegata da un periodo limitato di persistenza dell'alterazione dell'equilibrio acido-base. In uno studio sperimentale, effettuato sulla specie

canina, inducendo un'acidosi metabolica attraverso la somministrazione di acido cloridrico, è stato osservato un utilizzo preferenziale dei tamponi extracellulari nella fase iniziale. Il contributo dei tamponi intracellulari sembra, invece, diventare più importante nella fase avanzata di induzione con l'incremento del grado di acidosi (Schwarz et al., 1957). Sulla base di questa interpretazione, nel nostro primo studio sperimentale, dato il tempo limitato dell'induzione di acidosi metabolica, è stato necessario l'intervento dei soli tamponi extracellulari, senza la partecipazione aggiuntiva di quelli intracellulari, ed, in particolare, non si è reso necessario il tamponamento degli ioni idrogeno tramite lo scambio con gli ioni potassio intracellulari.

Nell'unico studio confrontabile con la nostra prima prova sperimentale (Zello et al., 2005) la perdita del riflesso della suzione risultava correlata con il grado di acidosi metabolica indotta dalla somministrazione di acido cloridrico. Sulla base di queste osservazioni resta aperta l'ipotesi che l'acidosi possa avere un effetto tossico diretto su alcune aree dell'encefalo (Naylor et al., 2006) e questo potrebbe essere vero soprattutto nei casi di acidosi cronica, dove esiste maggiore possibilità di equilibrare il pH del liquido cefalo-rachidiano a quello ematico (Naylor et al., 2006).

Data la rarità della presenza di D-lattacidemia senza acidosi, sia nei vitelli sia nell'uomo, è da sempre risultato difficile separare gli effetti dell'acidosi metabolica da quelli della D-lattacidemia in soggetti clinicamente malati. La correlazione inversamente proporzionale esistente tra le concentrazioni

ematiche di D-lattato e i valori di BE, osservata in vitelli affetti da diarrea (Lorenz, 2004a), è probabilmente la causa più plausibile del fatto che in molti studi clinici sia stata affermata una relazione di causa/effetto tra acidosi metabolica ed alterazioni di postura e stato del sensorio (Kasari e Naylor, 1984; Kasari e Naylor, 1985; Kasari e Naylor, 1986; Naylor, 1989; Geishauser e Thünker, 1997; Wendel et al., 2001).

In soggetti affetti da acidosi metabolica spontanea, inoltre, devono essere presi in considerazione, come principali responsabili dell'alterato stato clinico, altri fattori, oltre ad una semplice alterazione dell'equilibrio acido-base. Tra i potenziali meccanismi responsabili sono infatti considerati la disidratazione, l'azotemia prerenale, l'iperlattacidemia, l'iponatremia, l'iperpotassiemia, l'ipoglicemia, l'endotossitemia e la sepsi.

Tra questi fattori il ruolo del D-lattato nell'instaurarsi della sintomatologia clinica è stato confermato definitivamente grazie sia ai risultati da noi ottenuti nella terza prova sperimentale sia al contributo di altri Autori, che hanno segnalato un ruolo fondamentale di questo anione nella comparsa di una sintomatologia neurologica, sovrapponibile a quella da noi riscontrata (Lorenz, 2004b; Zello et al., 2005; Naylor et al., 2006).

Nel nostro terzo disegno sperimentale è stato osservato che le alterazioni della postura e dello stato del sensorio, che fino ad ora sono state attribuite all'acidosi metabolica, possono essere indotte dalla somministrazione

endovenosa di D-lattato sodico, che non ha avuto alcun effetto sull'equilibrio acido-base in vitelli sani.

In effetti, però, potrebbe essere fatta una critica al nostro disegno sperimentale poiché il D-lattato è stato somministrato in una soluzione ipertonica, provocando ipernatriemia e iperosmolarità. Queste ultime alterazioni non sono state, di fatto, considerate come possibili cause della sintomatologia clinica (Stämpfli, 2005). Questo è giustificabile dal fatto che nella seconda parte della seconda prova sperimentale a vitelli clinicamente sani è stata iniettata, per via endovenosa, una soluzione contenente L-lattato alla stessa concentrazione ed infusa per un tempo quattro volte superiore e non è stato osservato alcun segno clinico. Questo ci permette di escludere qualsiasi influenza della soluzione ipertonica sulla sintomatologia clinica di questi soggetti.

Nelle nostre prove sperimentali è stato dimostrato che solo la D-lattacidemia e non l'L-lattacidemia è in grado di indurre una sintomatologia clinica in vitelli sani, è stato persino osservato che l'iper L-lattacidemia induce un'alcalosi metabolica, come conseguenza della metabolizzazione epatica e renale dell'L-isomero, senza però provocare alcun risentimento clinico.

In vitelli affetti da diarrea o da acidosi ruminale spontanee la situazione clinica è, però, molto più complicata. In vitelli affetti da diarrea sopravvengono, in effetti, altri fattori che influenzano lo stato generale dei soggetti, quali alterazioni organiche e funzionali a livello del tratto gastro-enterico stesso, come ad esempio stati infiammatori, ipermotilità spastica o clonica e

distensione della parete intestinale (Radostits et al., 2007). In vitelli affetti da acidosi ruminale, alterazioni organiche a carico dei prestomaci, come ruminite o omasite necrotizzante, o dell'abomaso, come l'abomasite emorragica (Gentile et al., 1997), possono avere un ruolo inducendo ulteriori alterazioni cliniche. In entrambi i casi la D-lattacidemia è spesso accompagnata da una grave disidratazione e l'impatto di quest'ultima sulla sintomatologia clinica è quindi difficile da identificare. In uno studio su vitelli sperimentalmente disidratati, in cui è stato indotto uno stato di disidratazione del 14% del peso vivo, questi non hanno comunque manifestato né alterazioni della postura né dello stato del sensorio né del riflesso della suzione (Constable et al., 1998).

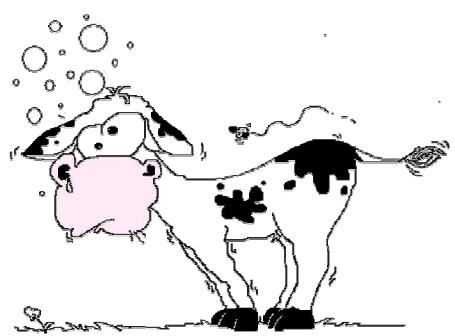
Si può quindi affermare che i fattori che influiscono maggiormente sulle condizioni generali di vitelli, aventi simili concentrazioni ematiche di D-lattato, sono stati patologici concomitanti, setticemia, dolore addominale e stress, come ad esempio il trasporto. È stato infatti dimostrato che questi fattori non devono essere sottostimati nei vitelli affetti da diarrea o da acidosi ruminale, poiché è stato osservato che nel 30% dei vitelli con diarrea, ricoverati e trattati con fluidoterapia, la sintomatologia neurologica si è risolta in circa 4 ore pur non evidenziando alcuna modificazione dei valori di D-lattacidemia (Lorenz e Vogt, 2006).

CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati presentati in questi lavori sperimentali le conclusioni che possono essere tratte sono:

- Un'acidosi metabolica semplice non induce una sintomatologia clinica evidente;
- La validità dei segni clinici, proposti in letteratura, per valutare lo stato di acidosi metabolica di vitelli affetti da diarrea neonatale o da acidosi ruminale dovrebbe essere criticamente rivalutata;
- I segni clinici tradizionalmente attribuiti all'acidosi metabolica sono dovuti soprattutto ad una D-lattacidemia;
- La sola L-lattacidemia non è in grado di indurre alcuna sintomatologia clinica.

In vitelli naturalmente affetti da patologie neonatali, come diarrea o acidosi ruminale, sono però necessari ulteriori studi per valutare il metabolismo del D-lattato e la sua escrezione per individuare, ad esempio, eventuali strategie per prevenire il suo accumulo. Inoltre è necessario indagare l'importanza dell'influenza di altri fattori, oltre alla D-lattacidemia, sulla comparsa della sintomatologia generale di questi vitelli, come ad esempio stati patologici concomitanti, setticemia, stress e dolore addominale.



BIBLIOGRAFIA

1. Anderson K.L., Nagaraja T.G., Morrill J.L. Ruminal metabolic development in calves weaned conventionally or early. *J Dairy Sci* 1987;**70**(5):1000-1005.
2. Bari de L., Atlante A., Guaragnella N., Principato G., Passarella S. D-lactate transport and metabolism in rat liver mitochondria. *Biochem J* 2002;**365**(2):391-403.
3. Barker S.B. e Summerson W.H. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J Biol Chem* 1941;**138**(2):535-554.
4. Baur T. Untersuchungen über den Einfluss der intraruminalen Verabreichung von Milch beim jungen Kalb. Vet Med Diss , München; 1993.
5. Booth A.J. e Naylor J.M. Correction of metabolic acidosis in diarrheal calves by oral administration of electrolyte solutions with or without bicarbonate. *J Am Vet Med Assoc* 1987;**191**(1):62-68.
6. Brandt R.B. e Siegel S.A. Methylglyoxal production in human blood. 67th Submolecular biology and cancer CIBA foundation symposium, Excerpta Medica, Amsterdam, NL: pp.211-223.
7. Brandt R.B., Siegel S.A., Waters M.G., Bloch M.H. Spectrophotometric assay for d-(-)-lactate in plasma. *Anal Biochem* 1980;**102**(1):39-46.
8. Braun U., Rihs T., Schefer U. Ruminal acidosis in sheep and goats. *Vet Rec* 1992;**130**(16):343-349.
9. Caldarini M.I., Pons S., D'agostino D., DePaula J.A., Greco G., Negri G., Ascione A., Bustos D. Abnormal fecal flora in a patient with short bowel syndrome. An in vitro study on effect of pH on D-lactic production. *Dig Dis Sci* 1996;**41**(8):1649-1652.

10. Cebra C.K., Cebra M.L., Garry F.B., Belknap E.B. Forestomach acidosis in six new world camelids. *J Am Vet Med Assoc* 1996;**208**(6):901-904.
11. Christopher M.M., Eckfeldt J.H., Eaton J.W. Propylene glycol ingestion causes D-lactic acidosis. *Lab Invest* 1990;**62**(1):114-118.
12. Cleek J.L. e Phillips R.W. Evaluation of a commercial preparation for oral therapy of diarrhea in neonatal calves: administration by suckling versus intubation. *J Am Vet Med Assoc* 1981;**178**(9):977-981.
13. Connor H., Woods H.F., Ledingham J.G.G. Comparison of the kinetics and utilisation of D(-)- and L(+)-sodium lactate in normal man. *Ann Nutr Metabol* 1983;**27**(6):481-486.
14. Constable P.D., Walker P.G., Morin D.E., Foreman J.H. Clinical and laboratory assessment of hydration status of neonatal calves with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* 1998;**212**(7):991-996.
15. Cori C.F. e Cori G.T. Glycogen formation in the liver from d- and l-lactic acid. *J Biol Chem* 1929;**81**(2):389-403.
16. Coronado B.E., Opal S.M., Yoburn D.C. Antibiotic-induced D-lactic acidosis. *Ann Intern Med* 1995;**122**(11):839-842.
17. Craig F.N. Renal tubular reabsorption, metabolic utilization and isomeric fractionation of lactic acid in the dog. *Am J Physiol* 1946;**146**(1):146-159.
18. Cross S.A. e Callaway C.W. D-lactic acidosis and selected cerebellar ataxias. *Mayo Clin Proc* 1984;**59**(3):202-205.
19. Dahlquist N.R., Perrault J., Callaway C.W., Jones J.D. D-lactic acidosis and encephalopathy after jejunoileostomy: response to overfeeding and to fasting in humans. *Mayo Clin Proc* 1984;**59**(3):141-145.
20. De Vrese M. e Barth C.A. Postprandial plasma D-lactate concentrations after yogurt ingestion. *Z Ernährwiss* 1991;**30**(2) :131-137.
21. De Vrese M., Koppenhoefer B., Barth C.A. D-lactic acid metabolism after an oral load of dl-lactate. *Clin Nutr* 1990;**9**(1):23-28.

22. Ding Z. e Xu Y. Lactic acid is absorbed from the small intestine of sheep. *J Exp Zool A* 2003;**295** (1):29-36.
23. Ding Z., Rowe J.B., Godwin I.R., Xu Y., Ball F.M., Atkinson S. No lactic acid adsorbed from the caecum and rumen of sheep. *Aust J Agric Res* 1998;**49**(2):293-301.
24. Dirken G. Der Pansenazidose-Komplex – neuere Erkenntnisse und Erfahrungen. *Tierärztl Prax* 1985;**13**(4):501-512.
25. Dirken G. e Baur T. Pansenazidose beim Milchkalb infolge Zwangsfütterung. *Tierärztl Umschau* 1991;**46**(5):257-261.
26. Dirksen G. e Garry F.B. Disease of forestomach in calves - Part I. *Comp Food Anim* 1987;**9**(4):F140-F146.
27. Dirksen G. Krankheiten von Haube und Pansen beim Milchkalb und Jungrind. In: Dirksen G., Gründer H.D., Stöber M. eds. *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. Berlin: Parey Buchverlag;2002:455-469.
28. Dirr L. e Dirksen G. Dysfunktion der Schlundrinne („Pansentrinker“) als Komplikation der neugeborenenendiarrhö beim Kalb. *Tierärztl Prax* 1989;**17**(4):353-358.
29. Dobson A. e Philipson T. The influence of the contents of the rumen and of adrenaline upon its blood supply. *J Physiol* 1956;**133**(1):76-77.
30. Doll K. „Trinkschwäche“/Anorexie beim neugeborenen Kalb: Ursachen, Folge und Behandlung. *Collegium Vet* 1990;**21**:16-18.
31. Dunlop R.H. e Hammond P.D. D-lactic acidosis of ruminants. *Ann N Y Acad Sci* 1965; **119**(3):1109-1132.
32. Duran M., van Biervliet J.P., Kamerling J.P., Wadman S.K. D-lactic aciduria, an inborn error of metabolism? *Clin Chim Acta* 1977;**74**(3):297-300.
33. Editoriale. The colon, the rumen, and D-lactic acidosis. *The lancet* 1990;**336**(8715):599-600.
34. Eizaguirre I., N. Garcia Urkia, Asensio A.B., Zubillaga I., Zubillaga P., Vidales C., Garcia-Arenzana J.M., Aldazabal P. Probiotic

- supplementation reduces the risk of bacterial translocation in experimental short bowel syndrome. *J Pediatr Surg* 2002;**37**(5):699-702.
35. Enerson B.E. e Drewers L.R. Molecular features, regulation and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery. *J Pharm Sci* 2003;**92**(8):1531-1544.
 36. Ewaschuk J.B. e Dieleman L.A. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006;**12**(37):5941-5950.
 37. Ewaschuk J.B., Naylor J.M., Barabash W.A., Zello G.A. High-performance liquid chromatographic assay of lactic, pyruvic and acetic acids and lactic acid stereoisomers in calf feces, rumen fluid and urine. *J Chromatogr B* 2004a;**805**(2):347-351.
 38. Ewaschuk J.B., Naylor J.M., Chirino-Trejo M., Zello G.A. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a potential probiotic for calves. *Can J Vet Res* 2004c;**68**(4):249-253.
 39. Ewaschuk J.B., Naylor J.M., Palmer R., Whiting S.J., Zello G.A. D-lactate production and excretion in diarrheic calves. *J Vet Intern Med* 2004b;**18**(5):744-747.
 40. Ewaschuk J.B., Naylor J.M., Zello G.A. Anion gap correlates with serum D- and DL-lactate concentration in diarrheic neonatal calves. *J Vet Intern Med* 2003;**17**(6):940-942.
 41. Ewaschuk J.B., Naylor J.M., Zello G.A. D-lactate in human and ruminant metabolism. *J Nutr* 2005;**135**(7):1619-1625.
 42. Ewaschuk J.B., Zello G.A., Naylor J.M. *Lactobacillus* GG does not affect D-lactic acidosis in diarrheic calves, in a clinical setting. *J Vet Intern Med* 2006;**20**(3):614-619.
 43. Ewaschuk J.B., Zello G.A., Naylor J.M., Brocks D.R. Metabolic acidosis: separation methods and biological relevance of organic acids and lactic acid enantiomers. *J Chromatogr B* 2002;**781**(1-2):39-56.

44. Flick M.J. e Konieczny S.F. Identification of putative mammalian D-lactate dehydrogenase enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;**295**(4):910-916.
45. Friedemann T.E., Cotonio M., Shaffer P.A. The determination of lactic acid. *J Biol Chem* 1927;**73**(1):335-358.
46. Gavazzi C., Stacchiotti S.m Cavalletti R., Lodi R. Confusion after antibiotics. *The Lancet* 2001;**357**(9266):1410.
47. Geishauser T. e Thünker B. Metabolische Azidose bei neugeborenen Kälbern mit Durchfall-Abschätzung an Saugreflex oder Stehvermögen. *Prakt Tierarzt* 1997;**78** (7):600-605.
48. Gentile A. e Rademacher G. Vergleichende Betrachtung der Veränderung des Säure-Basenhaushaltes bei der Pansenazidose des Rindes und beim sogenannten Kurzdarmsyndrom des Menschen. Proc 10th Magyar Buiatrikus Kongresszuz Közèp-Európai Buiatrikus Találkozó, Siófok, Ungary, 21-23 May 1998:47-51.
49. Gentile A. Ruminant acidosis in milk-fed calves. *Large Anim Vet Rounds* 2004;**4**(9):1-6.
50. Gentile A., Rademacher G., Klee W. Acidosi ruminale fermentativa nel vitello lattante. *Ob Doc Vet* 1997;**18**(12):63-75.
51. Gentile A., Sconza S., Lorenz I., Otranto G., Rademacher G., Famigli-Bergamini P., Klee W. D-lactic acidosis as a consequence of experimentally induced ruminal acidosis. *J Vet Med A* 2004;**51**(2):64-70.
52. Giesecke D. e Stangassinger M. Lactic acid metabolism. In: Ruckebusch Y., Thivend P. eds. *Digestive physiology and metabolism of ruminants*. Lancaster: MTP-Press;1980:523-539.
53. Giesecke D. e v. Wallenberg P. Metabolism of D(-)-lactic acid in rats given high intragastral doses. *Comp Biochem Physiol B* 1985;**82**(2):255-258.
54. Giesecke D. Probleme der Metabolisierung von D(-)Milchsäure. *Ärztzeitschr f Naturheilverf* 1988;**29**(1):67-80.

55. Giesecke D., Fabritius A., v. Wallenberg P. A quantitative study on the metabolism of D(-)-lactic acid in the rat and the rabbit. *Comp Biochem Physiol B* 1981;**69**(1):85-89.
56. Giesecke D., Stangassinger M., Henle K. D(-)-Milchsäure – ein Stoffwechselproblem. *Z Ernährungswiss* 1985;**24**(3):172-186.
57. Giesecke D., v. Wallenberg P., Fabritius A. D(-)lactic acid – a physiological isomer in the rat. *Experimentia* 1980;**36**(5):571.
58. Grove-White D.H. Pathophysiology and treatment of metabolic acidosis in the diarrhoeic calf. Proc 19th WBC, Edinburgh, UK, 8-12 July,1996:102-107.
59. Grude T. Laktat im Blut, Harn und Pansensaft von Kälbern, insbesondere bei „Pansentrinkern“. Vet Med Diss, München; 1999.
60. Grude T., Lorenz I., Rademacher G., Gentile A., Klee W. Levels of D- and L-lactate in rumen fluid, blood and urine in calves with and without evidence of ruminal drinking. Proc 32th Ann. Conv. AABP, Nashville, Tennessee, USA, 23-26 september,1999:213-214.
61. Gurevitch J., Sela B., Jonas A., Golan H., Yahav Y., Passwell J.H. D-lactic acidosis: a treatable encephalopathy in pediatric patients. *Acta Paediatr* 1993;**82**(1):119-121.
62. Halperin M.L. e Kamel K.S. D-lactic acidosis: turning sugar into acids in the gastrointestinal tract. *Kidney Int* 1996;**49**:1-8.
63. Harmon D.L., Britton R.A., Prior R.L. *In vitro* rates of oxidation and gluconeogenesis from L(+)- and D(-)lactate in bovine tissues. *Comp. Biochem. Physiol. B* 1984;**77**(2):365-368.
64. Haschke-Becher E., Baumgartner M., Bachmann C. Assay of D-lactate in urine of infants and children with reference values taking into account data below detection limit. *Clin Chim Acta* 2000;**298**(1-2):99-109.
65. Hasegawa H., Fukushima T., Lee J., Tsukamoto K., Moriya K., Ono Y., Imai K. Determination of serum D-lactic and L-lactic acids in normal subjects and diabetic patients by column-switching HPLC with pre-

- column fluorescence derivatization. *Anal Bioanal Chem* 2003;**377**(5):886-891.
66. Hove H. e Mortensen P.B. Colonic lactate metabolism and D-lactic acidosis. *Dig Dis Sci* 1995;**40**(2):320-330.
 67. Hudson M., Pocknee R., Mowat N.A.G. D-lactic acidosis in short bowel syndrome – an examination of possible mechanisms. *Q J Med* 1990;**74**(274):157-163.
 68. Jeppersen P.B. e Mortensen P.B. Colonic digestion and absorption of energy from carbohydrates and medium-chain fat in small bowel failure. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1999;**23**(Suppl 5):S101-S105.
 69. Judge M.A. e van Eys J. Excretion of D-lactic acid by humans. *J Nutr* 1962;**76**:310-313.
 70. Kalapos M.P. Methylglyoxal in living organism. Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol Lett* 1999;**110**(3):145-175.
 71. Karton M., Rettmer R.L., Lippkin E.W. Effect of parenteral nutrition and enteral feeding on D-lactic acidosis in a patient with short bowel. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1987;**11**(6):586-589.
 72. Kasari T.R. e Naylor J.M. Clinical evaluation of sodium bicarbonate, sodium L-lactate, and sodium acetate for the treatment of acidosis in diarrheic calves. *J Am Vet Med Assoc* 1985;**187**(4):392-397.
 73. Kasari T.R. e Naylor J.M. Further studies on the clinical features and clinicopathological findings of a syndrome of metabolic acidosis with minimal dehydration in neonatal calves. *Can J Vet Res* 1986;**50**(4):502-508.
 74. Kasari T.R. e Naylor J.M. Metabolic acidosis without clinical signs of dehydration in young calves. *Can Vet J* 1984;**25**(10):394-399.
 75. Kasari T.R. Metabolic acidosis in calves. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 1999;**15**(3):473-486.

76. Kasari T.R. Metabolic acidosis in diarrheic calves: the importance of alkalinizing agents in therapy. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 1990;**6**(1):29-43.
77. LaManna J.C., Harrington J.F., Vendel L.M., Abi-Saleh K., Lust W.D., Harik S.I. Regional blood-brain lactate influx. *Brain Res* 1993;**614**(1-2):164-170.
78. Lorenz I. e Vogt S. Investigations on the association of D-lactate blood concentrations with the outcome of therapy of acidosis, and with posture and demeanour in young calves with diarrhoea. *J Vet Med A* 2006;**53**(9):490-494.
79. Lorenz I. Influence of D-lactate on metabolic acidosis and on prognosis in neonatal calves with diarrhoea. *J Vet Med A* 2004a;**51**(9-10):425-428.
80. Lorenz I., Hartmann I., Gentile A. Determination of D-lactate in calf serum samples – an automated enzymatic assay. *Comp Clin Path* 2003;**12**(3):169-171.
81. Lorenz. I. Investigations on the influence of serum D-lactate levels on clinical signs in calves with metabolic acidosis. *Vet J* 2004b;**168**(3):323-327.
82. McLellan A.C., Phillips S.A., Thornalley P.J. Fluorometric assay of D-lactate. *Anal Biochem* 1992;**206**(2):39-46.
83. Medzihradsky F. e Lamprecht W. Stoffwechseluntersuchungen mit Essig-, Milch- und Zitronensäure. *Lebensm Unters Forsch* 1966;**130**:171-180.
84. Møller P.D., Diernæs L., Sehested J., Hyldgaard-Jensen J., Skadhauge E. Absorption and fate of L- and D-lactic acid in ruminants. *Comp Biochem Physiol A* 1997;**118**(2):387-388.
85. Müller F., Huber K., Pfannkuche H., Aschenbach J.R., Breves G., Gäbel G. Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;**283**(5):G1139-G1146.

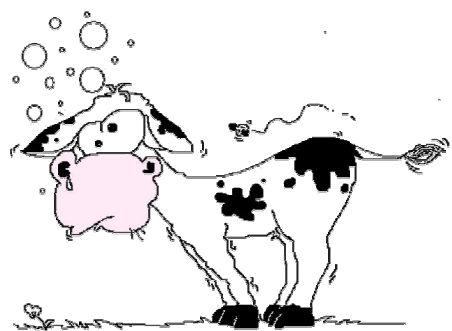
86. Naylor J.M. A retrospective study of the relationship between clinical signs and severity of acidosis in diarrheic calves. *Can Vet J* 1989;**30**(7):577-580.
87. Naylor J.M., Zello G.A., Abeyssekasa S. Advances in oral and intravenous fluid therapy of calves with gastrointestinal disease. Proc. 24th WBC, Nice, F, 15-19 October, 2006:139-150.
88. Nikolov Y. Clinical experimental studies on acute ruminal acidosis in buffaloes (*Bubalus bubalis* L.). V. Influence on several blood and rumen biochemical parameters. *Vet Arhiv* 1998;**68**(6):205-212.
89. Oh M.S., Phelps K.R., Traube M., Barbosa-Saldivar J.L., Boxhill C., Carroll H.J. D-lactic acidosis in a man with the short-bowel syndrome. *N Engl J Med* 1979;**301**(5):249-252.
90. Oh M.S., Uribarri J., Alveranga D., Lazar I., Bazilinski N., Carroll H.J. Metabolic utilization and renal handling of D-lactate in men. *Metabolism* 1985;**34**(7):621-625.
91. Ohmori S. e Iwamoto T. Sensitive determination of D-lactic acid in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1988;**431**(2):239-247.
92. Oldendorf W.H. Blood brain barrier permeability to lactate. *Eur Neurol* 1971;**6**(1):49-55.
93. Omole O.O., Brocks D.R., Nappert G., Naylor J.M., Zello G.A. High-performance liquid chromatographic assay of (±)-lactic acid and its enantiomers in calf serum. *J Chromatogr B* 1999;**727**(1-2):23-29.
94. Omole O.O., Nappert G., Naylor J.M., Zello G.A. Both L- and D-lactate contribute to metabolic acidosis in diarrheic calves. *J Nutr* 2001;**131**(8):2128-2131.
95. Owens F.N., Secrist D.S., Hill W.J., Gill D.R. Acidosis in cattle: a review. *J Anim Sci* 1998;**76**(1):275-286.
96. Packer R.A., Cohn L.A., Wohlstadter D.R., Shelton G.D., Naylor J.M., Zello G.A., Ewaschuk J.B., Williams D.A., Ruaux C.G., O'Brien D.P.

- D-lactic acidosis secondary to exocrine pancreatic insufficiency in a cat. *J Vet Intern Med* 2005;**19**(1):106-110.
97. Petersen C. D-lactic acidosis. *Nutr Clin Pract* 2005;**20**(6):634-645.
98. Phillips S.A. e Thornalley P.J. Formation of methylglyoxal and D-lactate in human red blood cells in vitro. *Biochem Soc Trans* 1993;**21**(2):163S.
99. Phillips S.A., Mirrlees D., Thornalley P.J. Modification of the glyoxalase system in streptozotocin-induced diabetic rats. Effects of the aldose reductase inhibitor Statil. *Biochem Pharmacol* 1993;**46**(5):805-811.
100. Poole R.C. e Halestrap A.P. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* 1993;**264**(4pt1):C761-C782.
101. Preston A. e Noller C. Metabolism of D-lactate by tissues of the ruminant digestive tract. *J Anim Sci* 1973;**37**(6):1403-1407.
102. Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W., Constable P.D. *Veterinary Medicine – A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th Ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2007:260-268.
103. Saavedra L. e Barbas C. Optimization of the separation lactic acid enantiomers in body fluids by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 2002;**766**(2):235-242.
104. Sack D.A., Rhoads M., Molla A., Molla A.M., Wahed M.A. Carbohydrate malabsorption in infants with rotavirus diarrhea. *Am J Clin Nutr* 1982;**36**(6):1112-1118.
105. Schelcher F., Marcillaud S., Braun J.P., Contrepolis M., Valarcher J.F., Navetat H. Metabolic acidosis without dehydration and no or minimal diarrhoea in suckler calves is caused by hyper D-lactatemia. Proc. 20th WBC, Sidney, AUS, 6-10 July, 1998:371-374.

106. Schwartz W.B., Ørning K.J., Porter R. The internal distribution of hydrogen ions with varying degrees of metabolic acidosis. *J Clin Invest* 1957;**36**(3):373-382.
107. Stämpfli H. D-lactate metabolism and the clinical signs of D-lactataemia in calves. *Vet Rec* 2005;**156**(25):816.
108. Stangassinger M. e Giesecke D. Untersuchungen zur Genese und Biochemie der Pansenazidose. 6. Renale Ausscheidung von Milchsäure-Isomeren. *Zbl Vet Med A* 1978;**25**(8):597-607.
109. Szenci O. Correlations between muscle tone and acid-base balance in newborn calves: experimental substantiation of a simple new score system proposed for neonatal status diagnosis. *Acta Vet Acad Scien Hung* 1982;**30**(1-3):79-84.
110. Tamai I., Takanaga H., Maeda H., Sai Y., Ogihara T., Higashida H., Tsuji A. Participation of a proton-cotransporter, MCT1, in the intestinal transport of monocarboxylic acids. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;**214**(2):482-489.
111. Tennant B., Harrold D., Reina-Guerra M. Physiologic and metabolic factors in the pathogenesis of neonatal enteric infections in calves. *J Am Vet Med Assoc* 1972;**161**(9):993-1007.
112. Thornalley P.J. Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. *Biochem J* 1988;**254**(3):751-755.
113. Thornalley P.J. The glyoxalase system:new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J* 1990;**269**(1):1-11.
114. Thornalley P.J., Langborg A., Minhas H.S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 1999;**344**(1):109-116.
115. Thurn J.R., Pierpont G.L., Ludvigsen C.W., Eckfeldt J.H. D-lactate encephalopathy. *Am J Med* 1985;**79**(6):717-721.

116. Tubbs P.K. e Greville G.D. The oxydation of D- α -hydroxy acids in animal tissues. *Biochem J* 1961;**81**(10):104-114.
117. Uribarri J., Oh M.S., Carroll H.J. D-lactic acidosis. A review of clinical presentation, biochemical features, and pathophysiologic mechanisms. *Medicine* 1998;**77**(2):73-82.
118. van Bruinessen-Kapsenberg E.G., Wensing T., Breukink H.J. Indigestionen der Mastkälber infolge fehlenden Schlundrinnenreflexen. *Tierärztl Umschau* 1982;**37**(7):515-517.
119. van Weeren-Keverling-Buisman A. Ruminant drinking in veal calves. Proefschrift, Utrecht; 1989.
120. Vanderhoof J.A. e Langnas A.N. Short-bowel syndrome in children and adults. *Gastroenterology* 1997;**113**(5):1767-1778.
121. Vella A. e Farrugia G. D-lactic acidosis: pathologic consequence of saprophytism. *Mayo Clin Proc* 1998;**73**(5):451-456.
122. Weldon A.D., Moise N.S., Rebhun W.C. Hyperkalemic atrial standstill in neonatal calf diarrhea. *J Vet Intern Med* 1992;**6**(5):294-297.
123. Wendel H., Sobotka R., Rademacher G. Untersuchungen zur klinischen Abschätzung des Azidosegrades bei Kälbern mit Neugeborenendurchfall. *Tierärztl Umschau* 2001;**56**(7):351-356.
124. Williams V.J. e Mackenzie D.D. The absorption of lactic acid from the reticulo-rumen of the sheep. *Aust J Biol Sci* 1965;**18**(4):917-934.
125. Wise G.H., Anderson G.W., Linnerud A.C. Relationship of milk intake by sucking and by drinking to reticular groove reactions and ingestion behaviour in calves. *J Anim Sci* 1984;**67**(9):1983-1992.
126. Wright M.R. e Jamali F. Methods for the analysis of enantiomers of racemic drugs application to pharmacological and pharmacokinetic studies. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1993;**29**(1):1-9.
127. Zello G.A., Abeysekara A.W.A.S., Wassef A.W.A., Naylor J.M. Evidence for D-lactic acid as a neurotoxic agent in acidotic diseases. *S African J Clin Nutr* 2005;**49**(Suppl 1):291.

128. Zello G.A., Omole O.O., Brocks D.R., Nappert G., Naylor J.M. Metabolic acidosis in neonatal diarrheic calves. *Can Fed Biol Sci* 1999;**42**:110.
129. Zhang D.L., Jiang Z.W., Jiang J., Cao B., Li J.S. D-lactic acidosis secondary to short bowel syndrome. *Postgrad Med J* 2003;**79**(928):110-112.
130. Žust J., Pestevšek U., Vengušt A. Einfluss der Milchsäuregärung im Dickdarm auf die akute Laktatazidose beim Rind. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 2000;**107**(9):359-363.



APPENDICE I:

TABELLE

PRIMA PROVA SPERIMENTALE

INDUZIONE DI ACIDOSI METABOLICA

Valori di BE prima (T0), durante (80 minuti) e al termine dell'infusione di 4000 ml di una soluzione di HCl 0,1M(50 ml/min) (mmol/l)																
	Minuti															
	T 0	20	40	60	80	90	100	110	120	130	140	150	180	210	270	390
Vit.																
113	4,8	-2,5	-8,9	-13,4	-17,0	-14,8	-13,8	-12,8	-12,2	-11,8	-11,9	-11,2	-10,4	-8,9	-7,3	-6,5
111	2,0	-5,7	-9,9	-14,1	-18,1	-15,5	-14,3	-13,8	-12,9	-12,6	-12,8	-11,8	-10,5	-9,3	-8,3	-6,5
114	2,9	-4,9	-10,5	-15,0	-18,9	-17,2	-14,9	-14,2	-13,6	-13,1	-12,8	-12,9	-11,8	-12,0	-10,0	-6,8
112	2,6	-5,4	-11,9	-16,9	-21,0	-18,6	-17,3	-16,6	-16,0	-15,3	-14,7	-14,1	-12,9	-12,0	-11,0	-9,3
117	1,3	-10,0	-14,9	-20,2	-25,1	-21,9	-20,9	-19,8	-19,0	-18,8	-18,5	-18,4	-17,1	-15,0	-12,0	-9,2
143	2,9	-4,6	-10,5	-15,1	-19,3	-17,4	-16,1	-14,3	-13,8	-13,4	-12,9	-12,2	-11,5	-10,9	-8,7	-5,8
144	4,7	-8,8	-16,1	-22,4	-27,6	-24,2	-21,8	-20,2	-19,1	-18,4	-18,0	-17,1	-15,8	-13,6	-12,4	-11,4
142	5,3	-8,4	-17,6	-26,1	-33,1	-30,6	-26,4	-24,6	-23,0	-21,7	-20,8	-20,1	-18,9	-17,7	-14,3	-10,3
145	4,4	-7,9	-15,1	-22,1	-29,4	-24,2	-22,9	-20,4	-19,4	-18,6	-17,6	-17,2	-15,4	-13,3	-11,9	-8,2
146	-1,6	-11,3	-17,2	-22,2	-26,3	-23,5	-21,2	-21,0	-19,9	-19,0	-17,9	-17,4	-18,3	-15,7	-13,3	-10,7
149	4,6	-2,1	-8,2	-14,8	-17,7	-16,6	-14,5	-12,3	-11,1	-10,3	-9,1	-8,4	-7,9	-6,8	-6,6	-5,5
150	4,7	-5,1	-10,2	-15,3	-20,4	-17,7	-16,4	-15,1	-14,6	-13,8	-12,7	-12,4	-10,7	-9,6	-9,0	-8,3
151	6,5	-0,7	-6,7	-12,0	-17,0	-14,3	-13,0	-13,6	-11,6	-11,9	-11,2	-10,8	-10,3	-9,0	-8,2	-4,7
152	7,4	-4,0	-9,2	-15,8	-21,2	-17,3	-17,2	-14,8	-13,9	-13,7	-12,5	-12,3	-11,7	-10,2	-9,1	-9,6
153	6,2	-3,9	-11,7	-18,2	-24,3	-22,6	-20,6	-18,3	-17,6	-16,9	-16,3	-15,6	-14,3	-12,3	-10,4	-7,5
Media	3,9	-5,7	-11,9	-17,6	-22,4	-19,8	-18,1	-16,8	-15,8	-15,3	-14,6	-14,1	-13,2	-11,7	-10,2	-8,0
DS	2,9	3,0	3,4	4,1	4,9	4,5	3,9	3,7	3,6	3,4	3,3	3,3	3,3	2,9	2,3	2,0

Na⁺ prima (T0), durante (80 minuti) e al termine dell'infusione di 4000 ml di una soluzione di HCl 0,1M(50 ml/min)																
(mmol/l)																
	Minuti															
	T 0	20	40	60	80	90	100	110	120	130	140	150	180	210	270	390
Vit.																
113	135	136	136	137	136	136	136	135	135	135	136	135	136	137	139	141
111	138	138	137	140	140	140	141	142	140	140	141	140	139	140	142	138
114	140	139	141	141	142	141	140	141	141	141	141	140	140	140	141	139
112[♦]																
117	134	133	134	135	134	136	135	135	134	135	136	135	135	137	136	135
143	140	139	139	141	140	141	144	140	140	142	141	140	143	142	140	139
144	134	137	138	137	139	140	138	138	136	138	138	137	137	138	138	137
142	137	140	142	142	144	145	140	140	141	140	140	140	142	140	142	140
145	137	138	139	140	141	140	140	139	140	140	139	139	140	139	140	137
146	136	137	137	138	139	139	139	139	139	139	139	139	139	139	139	138
149	134	135	135	135	135	136	135	135	134	135	135	135	136	135	135	134
150	135	136	136	137	140	138	137	137	138	138	138	138	139	139	139	138
151	135	137	137	137	138	139	138	138	138	139	139	139	140	139	138	138
152	137	137	138	139	140	141	141	141	141	143	141	142	143	140	138	138
153	137	136	136	136	138	139	137	137	138	139	140	140	140	139	138	135
Media	136	137	138	138	139	139	139	138	138	139	139	139	139	139	139	138
DS	2,0	1,8	2,2	2,3	2,7	2,4	2,6	2,3	2,5	2,5	2,0	2,2	2,5	1,7	2,0	1,9

K⁺ prima (T0), durante (80 minuti) e al termine dell'infusione di 4000 ml di una soluzione di HCl 0,1M(50 ml/min)																
(mmol/l)																
	Minuti															
	T 0	20	40	60	80	90	100	110	120	130	140	150	180	210	270	390
Vit																
113	4,2	4,5	3,9	3,9	4,2	4,2	4,1	4,4	4,3	4,3	4,7	4,6	4,3	4,2	4,7	4,3
111	4,4	3,9	4,0	3,9	4,1	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,1	4,1	4,4	4,6	4,3	4,6
114	4,6	3,9	3,8	4,0	4,2	4,3	4,4	4,3	4,4	4,1	4,2	4,3	4,3	4,3	4,1	4,5
112[♦]																
117	4,1	4,0	3,7	4,0	4,3	4,5	5,0	4,6	4,4	4,4	4,1	4,1	4,1	4,2	4,2	4,3
143	4,0	3,9	3,9	3,9	4,0	4,1	4,0	4,3	4,1	4,1	4,0	4,1	4,1	4,1	4,1	4,9
144	4,6	3,9	3,7	3,9	3,9	4,5	4,7	4,4	4,4	4,2	4,2	4,7	4,5	4,7	4,3	4,2
142	4,3	3,8	3,7	4,1	4,4	5,4	5,5	5,2	5,5	5,2	5,0	4,8	4,5	4,4	4,1	5,0
145	4,5	4,1	4,6	4,9	4,3	4,9	5,1	5,2	4,8	4,7	4,8	5,0	4,4	4,5	4,2	4,8
146	4,1	3,8	3,7	3,6	3,8	4,4	4,9	4,4	4,2	4,2	4,2	4,1	4,5	4,4	4,0	4,2
149	4,6	4,1	4,1	4,1	4,1	4,4	4,6	4,4	4,3	4,0	4,1	4,0	4,0	4,2	4,1	4,1
150	4,8	4,0	3,7	3,8	4,0	4,8	4,6	4,6	4,1	4,2	4,3	4,3	4,2	4,1	4,2	4,0
151	5,2	4,8	4,5	4,5	4,6	5,0	5,2	5,3	5,2	4,9	4,9	4,9	4,8	4,9	5,2	4,7
152	4,6	4,6	4,5	4,5	4,7	5,6	5,2	4,8	4,7	4,5	4,3	4,1	3,9	4,3	4,3	4,2
153	4,0	3,9	3,9	4,4	4,9	4,9	5,3	5,4	4,8	4,5	4,4	4,3	4,5	4,6	4,5	4,1
Media	4,43	4,09	3,98	4,11	4,25	4,66	4,77	4,68	4,53	4,39	4,38	4,39	4,32	4,39	4,31	4,42
DS	0,34	0,32	0,33	0,35	0,31	0,46	0,47	0,42	0,42	0,34	0,33	0,34	0,24	0,24	0,31	0,33

♦ Dati mancanti

Cl⁻ prima (T0), durante (80 minuti) e al termine dell'infusione di 4000 ml di una soluzione di HCl 0,1M(50 ml/min)																
(mmol/l)																
	Minuti															
	T 0	20	40	60	80	90	100	110	120	130	140	150	180	210	270	390
Vit																
113	95	104	109	114	116	114	114	114	113	112	112	112	110	111	111	110
111	103	110	114	118	121	120	120	119	119	119	118	118	116	115	116	112
114	101	107	112	119	123	119	118	118	119	117	116	116	115	114	114	112
112*																
117	99	108	114	118	122	120	121	119	118	118	117	117	116	116	114	109
143	100	109	114	117	122	120	119	118	118	118	118	117	117	115	112	110
144	97	111	116	122	125	122	122	120	120	118	119	119	117	114	113	115
142	101	116	122	129	133	130	130	127	126	125	124	124	123	122	120	114
145	102	112	119	125	129	127	126	125	124	123	122	122	120	117	116	113
146	104	113	119	123	127	124	126	124	122	121	121	121	120	118	117	116
149	97	103	109	115	119	116	115	114	113	112	112	112	113	111	110	107
150	100	104	111	117	119	120	118	117	116	116	116	116	116	114	113	113
151	95	104	112	116	120	119	117	117	116	115	116	115	116	113	110	110
152	92	106	111	117	122	121	119	118	117	116	117	116	116	112	110	110
153	93	106	112	119	124	121	120	119	119	118	118	117	116	115	111	109
Media	98	108	113	119	123	120	120	119	118	117	117	117	116	114	113	111
DS	3,74	3,93	3,90	4,15	4,42	4,05	4,43	3,79	3,69	3,65	3,34	3,41	3,11	2,91	3,03	2,56

Ca⁺⁺ prima (T0), durante (80 minuti) e al termine dell'infusione di 4000 ml di una soluzione di HCl 0,1M(50 ml/min)																
(mmol/l)																
	Minuti															
	T 0	20	40	60	80	90	100	110	120	130	140	150	180	210	270	390
Vit																
113	1,2	1,2	1,3	1,4	1,6	1,5	1,5	1,6	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,3
111	1,2	1,2	1,4	1,4	1,5	1,5	1,6	1,5	1,6	1,6	1,5	1,6	1,6	1,4	1,3	1,4
114	1,4	1,3	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,6	1,6	1,7	1,6	1,6	1,5	1,6	1,4	1,4
112*																
117	1,3	1,3	1,3	1,4	1,8	1,5	1,7	1,7	1,7	1,6	1,6	1,7	1,7	1,5	1,5	1,4
143	1,1	1,2	1,4	1,4	1,5	1,5	1,2	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,3	1,3	1,4	1,3
144	1,2	1,2	1,2	1,6	1,5	1,4	1,5	1,5	1,6	1,3	1,5	1,5	1,5	1,3	1,2	1,2
142	1,3	1,3	1,3	1,5	1,6	1,6	1,9	1,8	1,7	1,7	1,8	1,7	1,5	1,6	1,4	1,3
145	1,2	1,2	1,4	1,5	1,4	1,6	1,6	1,7	1,5	1,5	1,5	1,6	1,4	1,4	1,2	1,3
146	1,2	1,1	1,4	1,4	1,6	1,4	1,6	1,5	1,4	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4
149	1,2	1,1	1,3	1,4	1,4	1,3	1,5	1,4	1,5	1,3	1,5	1,4	1,4	1,4	1,3	1,2
150	1,2	1,1	1,3	1,5	1,1	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4	1,4	1,4	1,5	1,4	1,5	1,4
151	1,3	1,3	1,5	1,7	1,8	1,6	1,8	1,8	1,7	1,6	1,8	1,8	1,6	1,7	1,6	1,5
152	1,1	1,4	1,5	1,5	1,7	1,8	1,6	1,7	1,6	1,5	1,7	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5
153	1,1	1,4	1,6	1,8	1,8	1,7	1,9	2,0	1,9	1,8	1,7	1,7	1,7	1,8	1,6	1,6
Media	1,2	1,2	1,4	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,6	1,5	1,6	1,6	1,5	1,5	1,4	1,4
DS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Osmolarità prima (T0), durante (80 minuti) e al termine dell'infusione di 4000 ml di una soluzione di HCl 0,1M(50 ml/min)																
(mmol/l)																
	Minuti															
	T 0	20	40	60	80	90	100	110	120	130	140	150	180	210	270	390
Vit																
113	276	277	277	279	277	278	278	276	276	276	278	276	279	280	283	287
111	280	280	278	283	284	285	296	289	286	286	288	286	284	286	288	282
114	285	283	286	286	286	286	285	287	287	287	288	287	287	285	286	284
112*																
117	272	270	272	274	272	276	274	274	273	275	276	274	274	277	276	274
143	284	282	281	284	283	285	292	284	284	287	286	284	290	287	284	283
144	271	276	279	275	279	281	278	277	275	278	278	277	277	279	279	278
142	278	282	287	287	291	293	285	285	287	284	284	285	288	285	287	283
145	276	278	279	282	284	283	282	281	283	282	282	282	284	283	283	277
146	274	277	275	278	279	281	282	281	282	282	282	283	282	282	282	279
149	271	273	273	274	274	276	273	274	273	275	274	275	275	274	273	272
150	274	276	275	276	282	280	279	279	281	280	281	281	282	282	281	280
151	276	278	279	279	280	282	281	282	283	285	285	285	287	284	283	281
152	279	278	280	284	285	288	288	288	289	292	289	290	290	284	282	281
153	278	276	277	278	281	283	283	284	285	287	289	289	287	284	281	276
Media	277	278	278	280	281	283	283	282	282	283	283	282	283	282	282	280
DS	4,34	3,52	4,29	4,41	4,95	4,65	6,41	4,99	5,38	5,21	4,97	5,18	5,34	3,65	4,04	4,10

Disavanzo anionico prima (T0), durante (80 minuti) e al termine dell'infusione di 4000 ml di una soluzione di HCl 0,1M(50 ml/min)																
(mmol/l)																
	Minuti															
	T 0	20	40	60	80	90	100	110	120	130	140	150	180	210	270	390
Vit																
113	13,1	12,8	12,3	11,7	11,2	11,8	11,9	10,5	10,5	10,2	12,9	11,3	12,6	12,1	12,6	15,4
111	11,7	11,7	10,0	11,0	10,7	10,9	10,7	12,5	10,6	10,3	11,1	10,8	10,3	12,5	11,9	12,0
114	14,1	13,1	14,2	11,8	10,5	13,8	12,0	12,6	11,3	12,2	12,7	13,0	12,8	14,5	12,6	12,4
112*																
117	13,1	11,1	10,4	9,9	8,1	11,2	8,3	9,6	9,7	10,3	11,2	10,3	10,4	12,0	10,8	12,8
143	15,9	12,4	10,8	13,1	10,4	12,7	16,1	12,1	11,8	13,2	12,1	11,5	13,9	14,3	13,5	14,4
144	12,0	11,9	12,8	8,5	11,0	12,5	10,6	11,2	9,7	13,2	11,2	11,1	10,5	13,5	14,4	11,7
142	9,2	8,5	10,9	9,4	9,7	11,2	7,2	8,8	10,1	9,6	9,2	9,8	11,6	11,2	11,9	13,1
145	9,3	10,8	10,1	9,7	9,7	9,2	9,0	8,2	9,8	9,8	10,0	9,5	11,5	11,1	12,2	10,8
146	12,6	11,8	9,4	9,8	8,3	10,6	8,2	9,8	10,6	11,0	10,0	10,4	11,5	12,0	12,6	10,7
149	11,5	12,1	10,2	9,5	8,1	11,6	10,3	10,7	9,7	11,0	9,4	9,4	8,1	9,4	9,0	11,3
150	10,6	14,2	11,3	9,4	13,8	10,5	10,5	10,9	12,1	11,1	10,9	11,0	9,8	11,1	10,9	10,8
151	13,1	12,6	10,1	9,4	8,8	10,3	10,5	10,8	11,3	12,4	11,1	11,4	11,9	12,6	14,0	11,9
152	16,1	12,0	12,1	12,7	12,0	12,5	14,9	13,3	13,9	15,8	13,0	14,4	14,5	14,6	14,7	14,5
153	16,0	11,1	10,8	9,5	9,7	12,3	11,7	11,4	11,7	12,8	13,6	13,4	13,3	12,0	14,9	11,7
Media	12,7	11,9	11,1	10,4	10,1	11,5	10,9	10,9	10,9	11,6	11,3	11,2	11,6	12,4	12,6	12,4
DS	2,26	1,31	1,32	1,41	1,60	1,19	2,45	1,46	1,20	1,73	1,39	1,47	1,73	1,48	1,66	1,49

Glicemia prima (T0), durante (80 minuti) e al termine dell'infusione di 4000 ml di una soluzione di HCl 0,1M(50 ml/min)																
(mmol/l)																
	Minuti															
	T 0	20	40	60	80	90	100	110	120	130	140	150	180	210	270	390
Vit																
113	6,9	5,9	5,2	5,5	5,7	6,0	5,8	5,9	6,3	6,4	6,3	6,4	6,6	6,1	5,9	5,7
111	4,8	4,0	3,9	4,1	5,3	5,4	5,5	5,6	5,6	6,0	6,2	6,2	6,3	6,3	5,2	7,0
114	6,3	6,0	4,8	4,1	3,8	4,3	5,1	5,5	5,7	6,3	7,1	7,1	7,0	6,7	4,9	6,0
112*																
117	4,8	4,5	3,8	4,0	4,4	4,6	4,8	4,9	4,9	4,6	4,6	4,6	4,6	4,3	4,3	5,0
143	4,0	3,7	3,4	3,4	3,2	3,5	3,4	3,8	3,9	4,1	4,0	4,1	4,0	3,5	5,0	5,6
144	3,2	3,1	2,4	2,2	2,2	2,5	2,8	2,9	2,9	2,7	2,8	3,1	3,0	3,3	3,4	4,1
142	3,5	3,1	2,7	3,2	3,7	4,7	5,1	5,4	5,8	5,5	5,3	5,0	4,4	4,7	3,7	4,7
145	3,1	2,7	2,4	2,2	2,3	2,8	3,0	3,3	3,3	3,8	4,5	4,9	4,9	5,7	3,9	4,6
146	3,4	2,9	2,6	2,3	2,2	2,7	4,4	4,3	4,4	4,5	4,6	4,6	4,8	4,3	3,8	4,0
149	4,0	3,7	3,5	3,8	3,3	3,6	3,9	4,0	4,5	4,7	4,9	4,9	4,2	4,1	4,1	4,3
150	3,6	3,4	3,2	3,0	3,1	5,1	5,0	5,1	4,9	4,9	4,9	4,8	4,6	4,2	4,0	3,9
151	5,3	5,2	4,9	4,8	5,0	5,2	6,1	6,9	7,7	7,8	8,0	7,9	6,7	6,7	7,0	6,0
152	5,6	5,2	5,2	5,5	5,6	6,3	6,5	6,8	7,4	7,0	7,4	6,9	4,9	4,8	5,3	4,8
153	5,2	5,4	6,2	5,8	5,8	6,3	8,5	9,6	9,3	8,7	8,3	8,3	7,6	7,3	4,9	6,1
Media	4,55	4,20	3,87	3,85	3,97	4,50	4,99	5,29	5,47	5,50	5,64	5,63	5,26	5,14	4,67	5,13
DS	1,20	1,15	1,21	1,22	1,33	1,31	1,51	1,73	1,77	1,64	1,62	1,52	1,34	1,30	0,99	0,95

SECONDA PROVA SPERIMENTALE INDUZIONE DI IPER L-LATTACIDEMIA

PRIMA PARTE

		Concentrazione di L-lattato prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)														
		Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	
Vit																
2	1,3	15,4	13,1	10,7	10,1	9,2	6,0	4,6	3,2	2,4	2,0	1,6	1,3	1,4	1,0	
4	1,3	13,9	10,1	8,7	7,8	7,0	4,6	3,2	2,0	1,6	1,4	1,0	1,0	1,1	1,0	
1	0,8	11,2	9,2	7,9	6,8	6,1	3,4	2,2	1,7	1,1	0,9	0,9	0,8	0,8	0,7	
3	0,8	13,2	9,8	8,3	7,6	6,9	4,3	2,9	2,0	1,4	1,3	0,8	1,1	0,9	1,0	
11	1,0	11,9	9,9	8,7	7,9	7,5	5,3	3,9	3,2	2,9	2,5	2,0	1,8	1,4	1,0	
Media	1,0	13,1	10,4	8,9	8,0	7,3	4,7	3,4	2,4	1,9	1,6	1,3	1,2	1,1	0,9	
DS	0,25	1,66	1,54	1,08	1,23	1,15	0,99	0,92	0,72	0,75	0,63	0,52	0,38	0,28	0,13	

		Concentrazione di D-lattato prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)														
		Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	
Vit																
2	0,0	0,6	0,4	0,5	0,4	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	
4	0,0	0,5	0,4	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	
1	0,2	0,7	0,6	0,6	0,5	0,5	0,4	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,1	
3	0,1	0,6	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	
11	0,1	1,0	0,9	0,9	0,9	0,8	0,7	0,7	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	
Media	0,1	0,7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
DS	0,19	0,22	0,23	0,20	0,23	0,20	0,21	0,20	0,22	0,22	0,22	0,22	0,23	0,23	0,18	

Valori di BE prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
2	3,3							9,1			9,9				
4	5,7							10,8			11,0				
1	2,3							10,3			10,6				
3	4,2							9,4			9,1				
11	4,1							8,9			9,9				
Media	3,9							9,7			10,1				
DS	1,25							0,82			0,73				

Na ⁺ prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
2	138							142			142				
4	139							144			143				
1	138							141			141				
3	139							142			144				
11	136							140			141				
Media	138							142			142				
DS	1,22							1,48			1,30				

K ⁺ prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
2	4,2							3,7			3,5				
4	4,2							3,7			3,4				
1	3,8							3,4			3,6				
3	4,1							3,6			3,4				
11	4,1							3,5			3,3				
Media	4,08							3,58			3,44				
DS	0,16							0,13			0,11				

Cl⁻ prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
2	96							93			94				
4	98							95			94				
1	100							97			95				
3	97							95			95				
11	93							92			92				
Media	97							94			94				
DS	2,59							1,95			1,22				

Ca⁺⁺ prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
2	1,2							1,3			1,2				
4	1,3							1,1			1,1				
1	1,2							1,3			1,3				
3	1,2							1,2			1,1				
11	1,2							1,0			1,1				
Media	1,22							1,20			1,17				
DS	0,03							0,11			0,12				

Osmolarità prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
2	282							292			292				
4	283							294			293				
1	281							289			287				
3	283							290			294				
11	276							285			287				
Media	281							290			291				
DS	2,9							3,4			3,4				

Disavanzo anionico prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
2	17,2							17,4			16,3				
4	13,7							16,4			15,7				
1	14,8							12,8			12,9				
3	16,2							15,4			17,4				
11	16,6							17,5			16,4				
Media	15,7							15,9			15,8				
DS	1,42							1,93			1,70				

Glicemia prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
2	5,2							7,2			7,2				
4	5,9							6,7			7,2				
1	5,1							6,7			6,4				
3	4,8							6,4			6,7				
11	4,9							4,6			5,0				
Media	5,18							6,32			6,50				
DS	0,43							1,00			0,91				

Produzione di urine al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (ml)													
	T 0	Minuti											
Vit													
2													
4													
1													
3													
11													
Media													
DS													

Concentrazione di L-lattato nelle urine prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)													
	T 0	Minuti											
Vit													
2	0,03												
4	0,03												
1	0,30												
3	0,07												
11	0,09												
Media	0,10												
DS	0,11												

Concentrazione di D-lattato nelle urine prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)													
	T 0	Minuti											
Vit													
2	0,02												
4	0,03												
1	0,17												
3	0,08												
11	0,04												
Media	0,07												
DS	0,06												

SECONDA PARTE

Concentrazione di L-lattato prima (T0) e al termine dell'infusione di 400 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto e seguente infusione di 300 ml per 35 minuti) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
28	1,9	10,4	9,1	13,6	15,1	17,7	19,3	20,5	21,6	20,4	18,6	16,4	14,8	13,3	12,0
24	1,0	10,5	9,1	14,6	12,6	18,2	20,1	21,2	18,8	20,0	16,2	14,5	13,1	12,0	10,4
23	0,9	13,1	9,0	13,4	13,8	17,1	18,7	20,1	21,4	22,0	17,3	16,5	13,7	9,8	9,1
25	1,0	16,2	14,3	19,3	21,7	24,7	31,2	35,7	38,3	36,5	33,2	24,2	22,4	22,1	20,3
Media	1,2	12,6	10,4	15,2	15,8	19,4	22,3	24,4	25,0	24,7	21,3	17,9	16,0	14,3	13,0
DS	0,47	2,74	2,62	2,77	4,06	3,55	5,94	7,56	8,94	7,90	7,98	4,30	4,32	5,40	5,04

Concentrazione di D-lattato prima (T0) e al termine dell'infusione di 400 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto e seguente infusione di 300 ml per 35 minuti) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
28	0,1	1,0	0,8	1,0	1,0	1,1	1,2	1,3	1,5	1,5	1,2	1,8	1,2	1,0	0,8
24	0,1	0,8	0,7	0,9	0,9	1,0	1,1	1,0	0,9	1,2	0,9	0,7	0,9	0,8	0,7
23	0,2	0,9	0,7	0,9	1,1	1,1	1,2	1,5	1,6	1,7	1,4	1,5	1,5	1,2	1,2
25	0,1	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,8	0,7	0,8	0,7	0,7
Media	0,1	0,8	0,7	0,9	0,9	1,0	1,1	1,1	1,2	1,3	1,1	1,2	1,1	0,9	0,8
DS	0,05	0,17	0,08	0,12	0,17	0,14	0,20	0,31	0,38	0,35	0,27	0,56	0,32	0,22	0,24

Valori di BE prima (T0) e al termine dell'infusione di 400 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto e seguente infusione di 300 ml per 35 minuti) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
28	4,9	8,7	8,4	10,4	11,1	12,0	12,4	13,8	14,9	16,0	16,4	16,8	17,3	18,6	19,2
24	5,7	8,9	9,3	9,8	10,4	10,4	13,4	14,5	15,2	16,8	18,0	18,5	18,4	19,1	19,3
23	5,7	8,9	9,3	9,8	10,4	10,4	13,4	14,5	15,2	16,8	18,0	18,5	18,4	19,1	19,3
25	6,3	10,3	10,0	11,3	12,3	13,8	14,6	15,6	16,7	16,3	17,9	19,6	19,2	19,9	20,9
Media	5,7	9,2	9,3	10,3	11,1	11,7	13,5	14,6	15,5	16,5	17,6	18,4	18,3	19,2	19,7
DS	0,57	0,74	0,66	0,71	0,90	1,62	0,90	0,74	0,81	0,39	0,78	1,16	0,78	0,54	0,82

Na ⁺ prima (T0) e al termine dell'infusione di 400 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto e seguente infusione di 300 ml per 35 minuti) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
28	130	136	136	138	140	142	144	146	148	148	148	147	148	147	147
24	133	140	139	142	143	146	147	149	151	152	152	151	152	151	152
23	133	140	139	142	143	146	147	149	151	152	152	151	152	151	152
25	130	139	139	144	147	151	154	158	161	162	162	160	161	160	160
Media	132	139	138	142	143	146	148	151	153	154	154	152	153	152	153
DS	1,73	1,89	1,50	2,52	2,87	3,69	4,24	5,20	5,68	5,97	5,97	5,50	5,50	5,50	5,38

K ⁺ prima (T0) e al termine dell'infusione di 400 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto e seguente infusione di 300 ml per 35 minuti) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
28	4,1	3,8	3,8	3,9	3,6	3,4	3,3	3,3	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2
24	4,0	3,5	3,4	3,2	3,3	3,0	2,9	2,8	2,8	2,7	2,7	2,9	2,7	2,8	2,8
23	4,0	3,5	3,4	3,2	3,3	3,0	2,9	2,8	2,8	2,7	2,7	2,9	2,7	2,8	2,8
25	4,5	3,9	3,8	3,3	3,1	3,0	3,1	2,8	2,7	2,7	2,7	2,8	2,6	2,6	2,6
Media	4,15	3,68	3,60	3,40	3,33	3,10	3,05	2,93	2,88	2,83	2,83	2,95	2,80	2,85	2,85
DS	0,24	0,21	0,23	0,34	0,21	0,20	0,19	0,25	0,22	0,25	0,25	0,17	0,27	0,25	0,25

Cl⁻ prima (T0) e al termine dell'infusione di 400 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto e seguente infusione di 300 ml per 35 minuti) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
28	89	86	88	86	85	85	86	83	87	84	84	86	88	84	86
24	91	87	88	87	87	87	86	86	85	85	86	86	87	88	88
23	91	87	88	87	87	87	86	86	85	85	86	86	87	88	88
25	92	85	86	85	84	83	83	83	83	84	85	85	85	85	86
Media	91	86	87	86	86	85	85	84	85	84	85	86	87	86	87
DS	1,26	0,96	1,00	0,96	1,50	1,91	1,50	1,73	1,63	0,58	0,96	0,50	1,26	2,06	1,15

Ca⁺⁺ prima (T0) e al termine dell'infusione di 400 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto e seguente infusione di 300 ml per 35 minuti) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
28	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	0,9	1,0	1,0	1,1	1,0	1,1	1,1
24	1,1	0,3	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
23	1,1	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
25	1,1	0,9	0,9	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9	0,8	0,8	0,9
Media	1,12	0,80	0,99	0,92	0,94	0,91	0,90	0,87	0,89	0,88	0,92	0,96	0,92	0,94	0,94
DS	0,01	0,34	0,02	0,09	0,05	0,07	0,05	0,06	0,07	0,10	0,10	0,08	0,09	0,10	0,09

Osmolarità prima (T0) e al termine dell'infusione di 400 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto e seguente infusione di 300 ml per 35 minuti) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
28	266	277	276	281	286	290	294	299	302	302	302	302	302	300	301
24	271	284	282	289	290	296	299	303	307	309	308	308	308	308	309
23	271	284	282	289	290	296	299	303	307	309	308	308	308	308	309
25	265	282	282	293	298	306	313	321	328	330	330	327	327	327	327
Media	268	282	281	288	291	297	301	307	311	313	312	311	311	311	312
DS	3,2	3,3	3,0	5,0	5,0	6,6	8,2	9,8	11,5	12,1	12,3	10,9	10,9	11,5	11,0

Disavanzo anionico prima (T0) e al termine dell'infusione di 400 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto e seguente infusione di 300 ml per 35 minuti) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
28	15,1	19,6	18,4	19,3	22,3	23,4	24,1	26,5	23,8	24,7	24,0	21,6	19,2	19,7	17,8
24	14,2	21,6	19,8	23,2	23,5	26,7	25,0	25,9	28,4	27,3	24,1	23,0	22,0	20,3	20,2
23	14,2	21,6	19,8	23,2	23,5	26,7	25,0	25,9	28,4	27,3	24,1	23,0	22,0	20,3	20,2
25	9,7	22,0	21,6	25,6	28,2	30,9	33,2	36,2	38,2	38,9	34,7	31,5	30,9	29,4	27,4
Media	13,3	21,2	19,9	22,8	24,4	26,9	26,8	28,6	29,7	29,6	26,7	24,8	23,5	22,4	21,4
DS	2,44	1,08	1,31	2,61	2,61	3,07	4,27	5,06	6,07	6,35	5,32	4,53	5,09	4,66	4,16

Glicemia prima (T0) e al termine dell'infusione di 400 ml di una soluzione al 25% di L-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto e seguente infusione di 300 ml per 35 minuti) (mmol/L)															
	Minuti														
	T 0	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vit															
28	6,2	5,5	5,5	5,7	6,0	6,1	6,2	6,4	6,5	6,9	7,1	7,2	7,2	7,2	7,1
24	5,2	4,8	5,0	4,9	5,0	4,8	5,0	4,9	5,0	5,1	5,1	5,4	5,4	5,5	5,9
23	5,2	4,8	5,0	4,9	5,0	4,8	5,0	4,9	5,0	5,1	5,1	5,4	5,4	5,5	5,9
25	5,6	4,9	4,8	4,8	5,0	5,3	5,6	5,7	5,9	6,0	6,4	6,9	6,8	7,1	7,4
Media	5,55	5,00	5,08	5,08	5,25	5,25	5,45	5,48	5,60	5,78	5,93	6,23	6,20	6,33	6,58
DS	0,47	0,34	0,30	0,42	0,50	0,61	0,57	0,72	0,73	0,86	0,99	0,96	0,94	0,95	0,79

TERZA PROVA SPERIMENTALE INDUZIONE DI IPER D-LATTACIDEMIA

Concentrazione di L-lattato prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)																	
	T0	Minuti															
		2	4	6	8	10	20	30	40	50	60	70	80	90	120	240	1440
Vit																	
2	0,5	0,6	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,6
4	0,7	0,6	0,6	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	▲	▲	▲	▲	▲
7	0,7	0,6	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,3	0,4	0,3	0,1	0,2	0,3	0,3	0,5	0,5
9	1,1	1,2	1,1	1,0	1,1	1,0	0,9	0,9	0,8	0,8	0,7	0,8	0,7	0,8	0,8	0,6	0,8
8	1,0	0,9	0,8	0,8	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,4	0,4	0,7	0,5	0,5	0,4	0,6	0,8
Media	0,9	0,8	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,7
DS	0,25	0,27	0,25	0,25	0,27	0,24	0,19	0,22	0,22	0,16	0,16	0,24	0,19	0,21	0,21	0,10	0,13

Concentrazione di D-lattato prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)																	
	T0	Minuti															
		2	4	6	8	10	20	30	40	50	60	70	80	90	120	240	1440
Vit																	
2	0,1	18,7	16,4	14,8	14,2	13,7	10,9	10,6	10,0	9,5	9,2	9,1	8,6	8,0	7,4	5,8	0,3
4	0,1	16,4	13,1	12,6	12,4	11,5	9,8	8,8	8,7	8,4	7,9	8,1	8,2	7,7	7,3	6,3	1,6
7	0,1	17,9	14,4	13,7	12,0	11,5	9,7	8,5	8,1	7,5	6,5	6,3	5,9	6,2	6,0	4,6	0,4
9	0,0	13,8	11,3	11,1	10,7	9,67	9,5	8,8	7,9	8,1	7,5	7,3	7,1	7,1	6,6	5,4	0,5
8	0,2	15,2	12,4	11,2	10,3	9,39	7,9	7,9	7,7	7,1	7,3	6,8	6,7	6,4	6,71	5,2	0,8
Media	0,1	16,4	13,5	12,7	11,9	11,1	9,6	8,9	8,5	8,1	7,7	7,5	7,3	7,01	6,8	5,5	0,7
DS	0,07	1,98	1,95	1,58	1,54	1,73	1,04	1,02	0,93	0,91	0,9	1,09	1,09	0,79	0,56	0,65	0,51

Valori di BE prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)																	
	T0	Minuti															
		2	4	6	8	10	20	30	40	50	60	70	80	90	120	240	1440
Vit																	
2	4,5							6,8									
4	4,2							4,7									
7	3,6							4,0									
9	2,9							3,3									
8	2,3							2,5									
Media	3,5							4,3									
DS	0,90							1,60									

Na⁺ prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)																	
	T0	Minuti															
		2	4	6	8	10	20	30	40	50	60	70	80	90	120	240	1440
Vit																	
2	140							147									
4	140							144									
7	139							145									
9	140							144									
8	138							138									
Media	139,4							143,6									
DS	0,90							3,36									

K⁺ prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)																	
	T0	Minuti															
		2	4	6	8	10	20	30	40	50	60	70	80	90	120	240	1440
Vit																	
2	4,4							3,4									
4	4,0							3,5									
7	4,0							3,6									
9	4,0							3,5									
8	4,1							3,8									
Media	4,1							3,6									
DS	0,17							0,15									

Cl⁻ prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)																	
		Minuti															
	T0	2	4	6	8	10	20	30	40	50	60	70	80	90	120	240	1440
Vit																	
2	97							90									
4	94							94									
7	98							94									
9	95							92									
8	96							96									
Media	96							93									
DS	1,60							2,28									

Ca⁺⁺ prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)																	
		Minuti															
	T0	2	4	6	8	10	20	30	40	50	60	70	80	90	120	240	1440
Vit																	
2	1,1							1,2									
4	1,2							1,2									
7	1,1							1,1									
9	1,1							1,1									
8	1,1							1,1									
Media	1,13							1,15									
DS	0,04							0,03									

Osmolarità prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)																	
		Minuti															
	T0	2	4	6	8	10	20	30	40	50	60	70	80	90	120	240	1440
Vit																	
2	283							298									
4	285							294									
7	282							295									
9	283							293									
8	282							281									
Media	283							292									
DS	1,44							6,72									

**Disavanzo anionico prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato
(somministrazione i.v. a bolo in un minuto)
(mmol/L)**

	T0	Minuti																
		2	4	6	8	10	20	30	40	50	60	70	80	90	120	240	1440	
Vit																		
2	17,0							26,2										
4	20,3							23,0										
7	16,1							25,2										
9	20,0							25,9										
8	17,3							18,5										
Media	18,1							23,3										
DS	1,90							3,20										

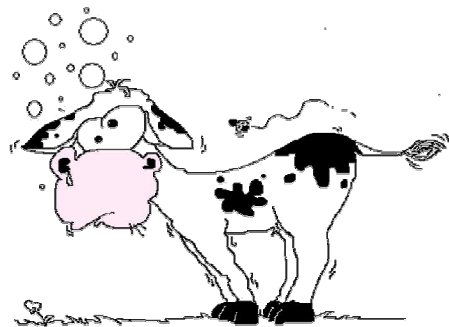
**Glicemia prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato
(somministrazione i.v. a bolo in un minuto)
(mmol/L)**

	T0	Minuti																
		2	4	6	8	10	20	30	40	50	60	70	80	90	120	240	1440	
Vit																		
2	3,8							5,2										
4	4,9							5,2										
7	4,7							5,0										
9	4,1							4,9										
8	5,7							5,7										
Media	4,6							5,2										
DS	0,74							0,31										

Produzione di urine al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (ml)													
	T 0	Minuti											
Vit													
2													
4													
7													
9													
8													
Media													
DS													

Concentrazione di L-lattato nelle urine prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)													
	T 0	Minuti											
Vit													
2													
4													
7													
9													
8													
Media													
DS													

Concentrazione di D-lattato nelle urine prima (T0) e al termine dell'infusione di 100 ml di una soluzione al 25% di D-lattato (somministrazione i.v. a bolo in un minuto) (mmol/L)													
	T 0	Minuti											
Vit													
2													
4													
7													
9													
8													
Media													
DS													



APPENDICE II:

LAVORI PUBBLICATI O PORTATI A

CONGRESSO ESTRAPOLANDO I DATI DI

QUESTA TESI

Lorenz I., Gentile A., Klee W. (2004)

Investigations on the clinical signs of hyper-D-lactatemia in calves.

Proceedings 23rd World Buiatrics Congress, 11-16/07/2004, Quebec,

Canada:111.

Vedi file allegato: Appendice II-1 WBC-04, HyperD-lactate.pdf

Lorenz I., Gentile A., Klee W. (2005)

Investigations of D-lactate metabolism and the clinical signs of D-lactataemia in calves.

Vet Rec.;**156**(13):412-415.

Vedi file allegato: Appendice II-2 Lorenz et al, Vet Rec 05.pdf

Gentile A., Lorenz I., Sconza S., Klee W. (2006)

Comparison of the clinical pictures in experimentally induced metabolic acidosis, hyper-L-lactatemia and hyper-D-lactatemia.

Proceedings 24th World Buiatrics Congress, 15-19/10/2006, Nice, France, CD,

Ref. OS28-1.

Vedi file allegato: Appendice II-3 WBC-06, Acidosi.pdf

Gentile A., Lorenz I., Sconza S., Klee W. (submitted)

Experimentally-induced systemic acidosis in calves: a clinical study.

J Vet Intern Med

Vedi file allegato: Appendice II-4 Gentile et al., JVIM.pdf

23rd World Buiatrics Congress • Québec/2004
July 11-16, 2004
23^e Congrès mondial de buiatrie • Québec/2004
11-16 juillet 2004

043 (2653)

INVESTIGATIONS ON THE CLINICAL SIGNS OF HYPER D-LACTATEMIA IN CALVES

Lorenz I.¹, Gentile A.², Klee W.¹

¹*Clinic for Ruminants, Sonnenstr. 16, Oberschleißheim, 85764, Germany;* ²*Dipartimento Clinico Veterinario, Via Tolara di Sopra, 50, Ozzano dell'Emilia (Bologna), 40064, Italy*

Introduction: The similarities between the clinical picture of the D-lactic acidosis in humans (incoordination, ataxia, loss of memory, disorientation, disturbance of consciousness up to coma) which occurs following resection of large portions of the small intestines when undigested carbohydrates are transported into the large intestine, and that reported for calves with metabolic acidosis due to neonatal diarrhea led to the idea that clinical signs in acidotic calves are due to hyper D-lactatemia rather than to acidosis per se. Therefore it was the objective of the study reported here to investigate whether clinical signs can be induced by hyper-D-lactatemia in the absence of acidosis.

Material and methods: Ten calves, up to 2 weeks old, were randomly assigned to either the D-lactate or the control group. "Test calves" received an injection of 25 g sodium-D-lactate (223.07 mmol) in 100 ml Aqua ad inj., control calves were given the same volume of 0.9 % sodium chloride, both solutions were warmed, and injected intravenously within one minute. Clinical examinations were performed by two clinical examiners that were blinded to the status (test or control) of the calves, prior to injection in order to ensure that calves involved in the study were in good health, and in short intervals up to four hours following injection.

Results: Between 8 to 40 minutes from the start of the experiment each calf that had received sodium-D-lactate could be distinguished with certainty from the control calf on the basis of clinical signs. All experimental calves showed impaired palpebral reflex, that is eyes were closed with a delay and as if in slow motion. Three calves were somnolent, the remaining two appeared quiet and withdrawn. All calves showed a staggering, "drunken" gait. In four calves long periods of motionless or slightly waving or tottering standing with lowered head and drooping ears could be observed. By contrast, no impairment of the sucking reflex was recorded in any of the calves.

Discussion: In various attempts that have been made in the past to estimate the degree of acidosis in calves with neonatal diarrhea on the basis of clinical signs authors list alterations in posture and/or behavior as signs of metabolic acidosis. The results of this study demonstrate that with the exception of impairment of sucking reflex, all signs that have been attributed to metabolic acidosis in calves can be reproduced by inducing hyper-D-lactatemia without acidosis.

Investigations of D-lactate metabolism and the clinical signs of D-lactataemia in calves

I. LORENZ, A. GENTILE, W. KLEE

Five clinically healthy calves received an intravenous injection of 25 g sodium D-lactate (223 mmol) in 100 ml sterile water and five control calves were given the same volume of 0.9 per cent sodium chloride. Two clinical examiners who were blinded to the status (test or control) of the calves observed that between eight and 40 minutes after the injections the calves that had received sodium-D-lactate could be distinguished with certainty from the control calves on the basis of their clinical signs, for example, an impaired palpebral reflex, somnolence and a staggering gait. One-compartment and two-compartment analyses of the changes in the plasma concentration of D-lactate, and its renal clearance, indicated that the calves metabolised considerable amounts of D-lactate.

D-LACTIC acidosis has been described as a disease only in human beings and ruminants. In cattle it was first reported as a result of acute ruminal acidosis due to grain overload, a condition which is easily reproducible and has been the subject of many scientific studies. The results showed that although mammals have no specific D-lactate dehydrogenase ruminants are able to metabolise D-lactate more efficiently than had been assumed (Stangassinger 1977). More recently, ruminal acidosis of milk-fed calves has been investigated; a low pH in the reticulorumen of young calves can be induced by forced feeding (by tubing or drenching), a dysfunction of the reticular groove reflex, and by the reflux of abomasal contents. The fermentation of carbohydrates in the liquids in the rumen by bacteria produces the isomers of lactic acid, among other compounds (Dirr 1988). It has been shown that a marked D-lactic acidosis can be induced in calves with ruminal acidosis by the instillation of whole milk into the reticulorumen (Gentile and others 2002).

In calves with neonatal diarrhoea the intestinal losses of bicarbonate and the formation of L-lactate by anaerobic glycolysis as a result of tissue hypoperfusion have long been considered to be the main causes of metabolic acidosis. However, since Grude and others (1999) first reported high serum concentrations of D-lactate in calves with neonatal diarrhoea that did not have abnormal ruminal contents, further evidence has been obtained that hyper-D-lactataemia frequently occurs in diarrhoeic calves (Omole and others 2001, Lorenz 2002). In human beings, substantial amounts of D-lactic acid are produced after the resection of large portions of the small intestines, when undigested carbohydrates are transported into the large intestine. The similarity of the clinical symptoms of the so-called short-bowel syndrome (incoordination, ataxia, loss of memory, disorientation, headaches, slurred speech and disturbance of consciousness up to coma) described by Uribarri and others (1998) to the clinical signs observed in diarrhoeic calves with metabolic acidosis led to the assumption that these signs are influenced more by the concentration of D-lactate than by the degree of acidosis. In a study of calves with naturally acquired diarrhoea, Lorenz (2004) has shown that changes in behaviour, and particularly in posture, can be better explained by an increase in serum D-lactate concentration than by a decrease in base excess. The disturbance of the palpebral reflex appears to be due almost completely to high levels of D-lactate. In the present study all the calves had base excess values less than -10 mmol/litre, and it was the aim of the study to investigate whether clinical signs could be induced by hyper-D-lactataemia in the absence of acidosis. Previous studies of the metabolism of D-lactate in ruminants have used adult animals (Stangassinger 1977), and an additional objective was to investigate the ability of young calves to eliminate D-lactate from the blood.

MATERIALS AND METHODS

Ten clinically healthy, male Holstein-Friesian calves up to 14 days old were obtained from a local dealer; their farm of origin and history of colostrum intake were not considered. Their mean (sd) bodyweight was 42.7 (4.5) kg.

On each of five consecutive days, a pair of the calves were randomly assigned to be treated either with D-lactate or with normal saline. Once a calf had received D-lactate it was excluded from further trials. After the morning feeding of 1.5 litres of whole milk, the calves were weighed, and an intravenous catheter (FEP radio-opaque, non-pyrogenic, G 14 [2.0 × 70 mm]; Delta Med Medical Services) was inserted into a jugular vein, and a urine collecting bag (Urodress; Convatec, Bristol-Meyers Squibb) was fixed around the prepuce for the continuous collection of urine. The two calves were sampled simultaneously throughout the 24 hours of the study. One calf was given 25 g sodium-D-lactate (223.1 mmol) in 100 ml sterile water, and the control calf was given the same volume of 0.9 per cent sodium chloride; both solutions were warmed and injected intravenously within one minute. Blood samples were taken before the injection, and at two minute intervals for 10 minutes, at 10 minute intervals for 90 minutes, and two, four and 24 hours after the injection into vials containing a glycostatic anticoagulant containing EDTA and potassium fluoride. The intravenous catheter was rinsed by the aspiration and re-injection of blood continuously throughout the first 10 minutes, and then before each sampling. The blood samples were centrifuged immediately and the plasma was stored at -20°C . Blood gases were analysed before the injection, to check that the values were within the normal ranges, and 30 minutes after the injection, to assess any changes in acid-base status that might have been responsible for any clinical signs. Urine was collected after two, four and 24 hours. Before the injection, and at the end of sampling periods, urination was provoked by massaging the prepuce. The volume of urine collected was measured, it was cooled, well mixed and a sample was taken and stored at -20°C .

The calves were examined before the injection by two examiners to check that they were in good health, and at short intervals up to four hours. Special attention was paid to changes in posture, gait and behaviour, and to the palpebral and sucking reflexes. The examiners did not know whether the calves had received D-lactate or saline.

The concentrations of D- and L-lactate in plasma and urine were determined by enzymatic methods on an automatic analyser (Hitachi 705) three days after the last sampling. L-lactate was oxidised to pyruvate by the specific enzyme lactate oxidase (Diagnostic kit: Lactate, 1822837; Roche Diagnostics) and D-lactate was determined by using D-lactate dehydrogenase as described by Lorenz and others (2003).

Veterinary Record (2005)
156, 412-415

I. Lorenz, DrMedVet,
W. Klee, DrMedVet,
Clinic for Ruminants,
University of Munich,
Sonnenstraße 16,
D-85764
Oberschleißheim,
Germany
A. Gentile, Dr,
Dipartimento Clinico
Veterinario, University of
Bologna, Bologna, Italy

TABLE 1: Mean (sd) plasma concentrations of D-lactate in five calves up to 24 hours after injection

Time of sampling (minutes)	D-lactate concentration (mmol/l)	Time of sampling (minutes)	D-lactate concentration (mmol/l)
Before injection	0.1 (0.07)	50	8.1 (0.9)
2	16.4 (2.0)	60	7.7 (1.0)
4	13.5 (1.9)	70	7.5 (1.1)
6	12.7 (1.6)	80	7.3 (1.1)
8	11.9 (1.5)	90	7.1 (0.8)
10	11.1 (1.7)	120	6.8 (0.6)
20	9.6 (1.0)	240	5.5 (0.6)
30	8.9 (1.0)	1440	0.7 (0.5)
40	8.5 (0.9)		

The mean concentrations of D-lactate were subjected to one-compartment (Dost 1968) and two-compartment analysis (Greenblatt and Koch-Weser 1975). The renal clearance of D-lactate was calculated for the period from 120 to 240 minutes after the injection from the formula:

$$\text{Clearance} = \frac{U \times V}{P}$$

in which U is the concentration of D-lactate in the urine, V is the minute volume of urine, and P is the mean of the plasma concentrations of D-lactate at 120 minutes and 240 minutes.

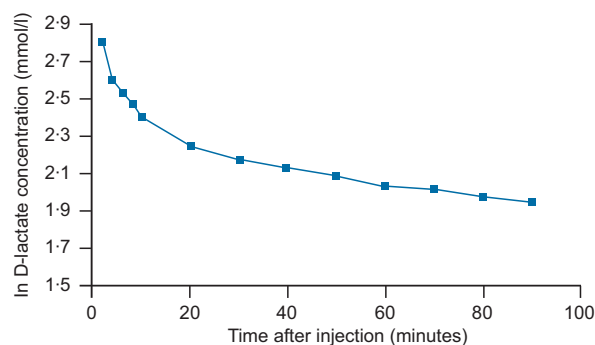
The study was carried out under the supervision of the local 'Centralised Veterinary Service' for the Welfare of Experimental Animals at the University of Bologna and with the approval of the Ethical Review Committee of Animal Experimentation of the University of Bologna.

RESULTS

Table 1 gives the mean (sd) plasma concentrations of D-lactate at the different sampling times. There was no difference between the base excess values of the samples taken before the injection of D-lactate and 30 minutes later. There were no changes in the plasma concentrations of L-lactate throughout the investigation period, with values ranging from 0.15 to 1.19 mmol/l.

Fig 1 shows a semilogarithmic plot of the changes in the mean plasma concentrations of D-lactate. From 30 minutes after the injection the rate of decline was considered to be linear ($r=0.99$). The parameters derived from the one-compartment and two-compartment analyses are listed in Table 2. The renal clearance between 120 and 240 minutes after the injection was 27.5 ml/minute, much lower than the clearances derived from the one-compartment and two-compartment models.

Between eight and 40 minutes after the start of the injection, the calves that had received sodium-D-lactate could be distinguished with certainty from the control calves on the basis of their clinical signs. They had an impaired palpebral reflex; in all of them the eyes closed after a short delay and as

**FIG 1: Natural logarithms of the mean plasma D-lactate concentrations in five calves after the injection of 223 mmol sodium D-lactate**

if in slow motion, in one the eyes closed incompletely and in two there was a delay before their eyes reopened. Three of the calves were somnolent, and the other two appeared quiet and withdrawn. Four of the calves had a markedly staggering, 'drunken' gait, but the gait of the other was less severely affected. In four of the calves, long periods were recorded during which they stood motionless or slightly wavering or tottering with their heads lowered and their ears drooping. Four of the calves lay down more often and/or for longer periods than the control calves and had to be helped to rise, and four assumed unphysiological postures either while standing, for example, a sawhorse stance, or while lying down, for example, with one foreleg extended backwards parallel to the body, for long periods.

No impairment of the sucking reflex was observed in any of the calves. After four hours all the calves appeared clinically normal, and they drank their midday feed of 1.5 litres of whole milk readily.

DISCUSSION

Although D-lactic acidosis has been known as a disease of ruminants (Dunlop and Hammond 1965) and human beings (Oh and others 1979) for decades, the mechanisms underlying the accompanying neurological signs are not understood. It has not even been determined whether D-lactic acid itself, or other substances produced under the same conditions, are toxic to the brain (Uribarri and others 1998). Under natural conditions the accumulation of D-lactate is usually accompanied by metabolic acidosis, and this may also contribute to the clinical signs.

Various attempts have been made to estimate the degree of metabolic acidosis in calves with neonatal diarrhoea on the basis of their clinical signs (Kasari and Naylor 1984, 1985, 1986, Naylor 1989, Geishauser and Thünker 1997, Wendel and others 2001), including changes in posture and/or behaviour. Recent research by Lorenz (2004) has provided strong evidence that even in calves with neonatal diarrhoea the neurological signs are triggered by the same mechanisms as in ruminal acidosis in cattle, or short-bowel syndrome in human beings. The results of the present study show that with the exception of any impairment of the sucking reflex, all the signs that have been attributed to metabolic acidosis can be reproduced by inducing hyper-D-lactataemia without acidosis. The plasma levels produced in this study were within the range of those observed in diarrhoeic calves (Lorenz 2004). The mechanism by which the signs may be produced is unknown, and the question is beyond the scope of this study. Cross and Callaway (1984) suggested that the effects of D-lactate may be caused by its interference with pyruvate metabolism.

TABLE 2: Parameters derived from the one-compartment and two-compartment analyses of the plasma D-lactate concentration curve

	One-compartment	Two-compartment	
Slope	-0.00379	V1 (central compartment) (l)	12.3
Intercept with ordinate (mmol/l)	2.29	V2 (peripheral compartment) (l)	9.9
Theoretical volume of distribution (l)	22.6	Vd (l)	22.2
Half-life (minutes)	183	Clearance (ml/min/kg)	84.0
Total clearance (ml/min/kg)	85.6		

In human beings it has been observed that the plasma concentration of D-lactate at which clinical signs occur is variable with a minimal reported value of 3.1 mmol/l (Uribarri and others 1998), and in the present study the intensity of the signs shown by the calves varied. Underlying deficiencies, for example, caused by malnutrition, have been suggested to explain this phenomenon (Hudson and others 1990). The calves were apparently adequately fed, but as the feeding regimen on their farm of origin was not known, minor deficiencies, for example, of vitamins, cannot be excluded.

When the first case of D-lactic acidosis was described in human beings (Oh and others 1979), the slow metabolism of D-lactate in mammals was considered to be the main factor responsible for its accumulation in the blood. At this time it had already been demonstrated that ruminants could metabolise D-lactate efficiently, although more slowly than L-lactate (Stangassinger 1977). It is now known that this is also true for human beings (Oh and others 1985). In ruminants and in human beings the rate of elimination of D-lactate from the blood decreases as its blood concentration increases (Stangassinger 1977). The concentrations of D-lactate induced in the calves in this experiment were higher than in any previous report of experimentally induced D-lactataemia, and it is therefore not surprising that the plasma half-life of D-lactate (183 minutes) was longer than that reported before (Stangassinger 1977). Nevertheless, the calves were able to eliminate considerable amounts of D-lactate from the blood. The mean value for its renal clearance was much lower than the glomerular filtration rate (Klee 1985), providing strong evidence of the tubular reabsorption of D-lactate. The fact that the total clearance and the clearance predicted by the two-compartment model were much greater than the renal clearance indicates that D-lactate was being metabolised by the calves. It is therefore uncertain whether the accumulation of D-lactate frequently observed in neonatal calves with diarrhoea (which in the study of Lorenz [2004] ranged up to 18.4 mmol/l) may be due only to its overproduction in the gastrointestinal tract, or may also be triggered by other factors. Ruminants lack D-lactate dehydrogenase, and the non-specific enzyme D-2-hydroxy acid dehydrogenase is considered to be responsible for D-lactate metabolism (Tubbs 1965, Cammack 1969). In vitro, the activity of this enzyme is diminished by a low pH (Tubbs 1965); the tendency of calves with diarrhoea to develop metabolic acidosis due to the loss of bicarbonate may therefore be one reason for the occurrence of hyper-D-lactataemia in these animals.

References

- CAMMACK, R. (1969) Assay, purification and properties of mammalian d-2-hydroxy acid dehydrogenase. *Biochemical Journal* **115**, 55-63
- CROSS, S. A. & CALLAWAY, C. W. (1984) D-lactic acidosis and selected cerebellar ataxias. *Mayo Clinic Proceedings* **59**, 202-205
- DIRR, L. (1988) Untersuchungen über die Dysfunktion des Schlundrinnenreflexes beim jungen Kalb. DrMedVet thesis, University of Munich, Germany
- DOST, F. H. (1968) Grundlagen der Pharmakokinetik. 2nd edn. Stuttgart, Thieme Verlag, pp 35-36, 57
- DUNLOP, R. H. & HAMMOND, P. B. (1965) D-lactic acidosis of ruminants. *Annals of the New York Academy of Sciences* **119**, 1061-1065
- GEISHAUSER, T. & THÜNKER, B. (1997) Metabolische Azidose bei neugeborenen Kälbern mit Durchfall – Abschätzung an Saugreflex und Stehvermögen. *Praktischer Tierarzt* **78**, 600-605
- GENTILE, A., SCONZA, S., LORENZ, I., OTRANTO, G., RADEMACHER, G., FAMIGLI BERGAMINI, P. & KLEE, W. (2002) D-lactic metabolic acidosis in calves as a consequence of experimentally induced ruminal acidosis. In Abstracts of the XXII World Buiatrics Congress. Hannover, Germany, August 18 to 23, 2002. p 175
- GREENBLATT, D. J. & KOCH-WESER, J. (1975) Clinical pharmacokinetics. *New England Journal of Medicine* **293**, 702-705, 964-970
- GRUDE, T., LORENZ, I., RADEMACHER, G., GENTILE, A. & KLEE, W. (1999) Levels of D- and L-lactate in rumen liquid, blood, and urine in calves with and without evidence of ruminal drinking. In Proceedings of the 32nd Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners. Nashville, USA, September 23 to 25, 1999, pp 213-214
- HUDSON, M., POCKNEE, R. & MOWAT, N. A. G. (1990) D-lactic acidosis in short-bowel syndrome. An examination of possible mechanisms. *Quarterly Journal of Medicine* **274**, 157-163
- KASARI, T. R. & NAYLOR, J. M. (1984) Metabolic acidosis without clinical signs of dehydration in young calves. *Canadian Veterinary Journal* **25**, 394-399
- KASARI, T. R. & NAYLOR, J. M. (1985) Clinical evaluation of sodium bicarbonate, sodium L-lactate, and sodium acetate for the treatment of acidosis in diarrheic calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **187**, 392-397
- KASARI, T. R. & NAYLOR, J. M. (1986) Further studies on the clinical features and clinico-pathological findings of a syndrome of metabolic acidosis with minimal dehydration in neonatal calves. *Canadian Journal of Veterinary Research* **50**, 502-508
- KLEE, W. (1985) Untersuchungen über die Nierenfunktion bei gesunden und an akutem Durchfall erkrankten Kälbern. PhD thesis, University of Munich, Germany
- LORENZ, I. (2002) Untersuchungen zur Bedeutung der D-Laktatazidose bei Kälbern mit Neugeborenenenddurchfall. In Proceedings of the 11 Jahrestagung der Fachgruppe 'Innere Medizin und Klinische Laboratoriumsdiagnostik'. Munich, Germany, February 13 to 16, 2002, pp 19-20
- LORENZ, I. (2004) Investigations on the influence of serum D-lactate levels on clinical signs in calves with metabolic acidosis. *Veterinary Journal* **168**, 323-327
- LORENZ, I., HARTMANN, I. & GENTILE, A. (2003) Determination of D-lactate in calf serum samples – an automated enzymatic assay. *Comparative Clinical Pathology* **12**, 169-171
- NAYLOR, J. M. (1989) A retrospective study of the relationship between clinical signs and severity of acidosis in diarrheic calves. *Canadian Veterinary Journal* **30**, 577-580
- OH, M. S., PHELPS, K. R., TRAUBE, M., BARBOSA-SALDIVAR, J. L., BOXHILL, C. & CARROLL, H. J. (1979) D-lactic acidosis in a man with the short-bowel syndrome. *New England Journal of Medicine* **301**, 249-252
- OH, M. S., URIBARRI, J., ALVERANGA, D., LAZAR, I., BAZILINSKI, N. & CARROLL, H. J. (1985) Metabolic utilization and renal handling of D-lactate in men. *Metabolism* **34**, 621-625
- OMOLE, O. O., NAPPERT, G., NAYLOR, J. M. & ZELLO, G. A. (2001) Both L- and D-lactate contribute to metabolic acidosis in diarrheic calves. *Journal of Nutrition* **131**, 2128-2131
- STANGASSINGER, M. (1977) Die Stoffwechselkinetik von D(-)-Milchsäure bei Wiederkäuern. DrMedVet dissertation, University of Munich, Germany
- TUBBS, P. K. (1965) The metabolism of d-alpha hydroxy acids in animal tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences* **119**, 920-926
- URIBARRI, J., OH, M. S. & CARROLL, H. J. (1998) D-lactic acidosis – a review of clinical presentation, biochemical features, and pathophysiologic mechanisms. *Medicine* **77**, 73-82
- WENDEL, H., SOBOTKA, R. & RADEMACHER, G. (2001) Untersuchungen zur klinischen Abschätzung des Azidosegrades bei Kälbern mit Neugeborenenenddurchfall. *Tierärztliche Umschau* **56**, 351-356

Comparison of the clinical pictures in experimentally induced metabolic acidosis, hyper-L-lactatemia and hyper-D-lactatemia.

Gentile A. - Lorenz I.* - Sconza S. - Klee W.* (Veterinary Clinical Department, Bologna, Italy and *Clinic for Ruminants, Munich, Germany)

In calves with diarrhoea, systemic acidosis and hyper-L- and D-lactatemia constitute the most important metabolic consequences. Recent studies indicate, however, that clinical signs are determined more by the extent of D-lactate ! accumulation than by the metabolic acidosis. We summarize the results of different trials in which the single effects of metabolic acidosis, hyper-L-lactatemia, and hyper-D-lactatemia on the clinical condition were studied.

1st trial: induction of metabolic acidosis:

15 Holstein calves received 4.0 l of a 0.1M HCl solution i.v. over a period of 80 minutes (50 ml/min).

The procedure managed to provoke a relatively severe metabolic acidosis, that reached a peak ABE mean value of -22.4 mmol/l (range -17.0 to -33.1 mmol/l). Despite the acidemia during the entire observation period no calves showed any clinical repercussions.

2nd trial: induction of hyper-L-lactatemia:

5 Holstein calves received 400 ml of a 25% L-lactate solution: 100 ml as i.v. bolus (1 min.), and 300 ml via an i.v. infusion over 35 minutes.

The experimental procedure provoked a severe hyper-L-lactatemia that reached a peak mean value of 25.0 mmol/l at the end of the infusion (range 18.8 to 38.3 mmol/l). No clinical signs accompanied the hyper-L-lactatemia. Signs of metabolic alkalosis were observed.

3rd trial: induction of hyper-D-lactatemia:

5 Holstein calves received 100 ml of a 25% D-lactate solution via an i.v. bolus (1 minute).

A clear increase of the D-lactatemia was observed right from the first control after the administration. At this time the mean value was 16.4 mmol/l (range 13.8 to 18.7 mmol/l).

Afterwards the D-lactatemia tended slowly to recover its pre-trial value.

Between eight and 40 minutes after the injection all calves showed the following clinical signs: impairment of the palpebral reflex, somnolence, staggering, prolonged periods of motionless, standing with unphysiological postures, lowered and sometimes waving head, and drooping ears. Calves lay down often and for longer, and had to be helped to rise. No impairment of the sucking reflex was observed. After four hours all calves appeared clinically normal. No deviation of the acid-base balance was observed.

Conclusions

The results of the summarized studies show that with the exception of any impairment of the sucking reflex, all the signs once attributed to metabolic acidosis can be reproduced by inducing hyper-D-lactatemia without acidosis.

1 **Experimentally-induced systemic acidosis in calves: a clinical study**

2 Arcangelo Gentile, Ingrid Lorenz, Sarah Sconza, and Wolfgang Klee

3 *From the Veterinary Clinical Department, University of Bologna, Italy (Gentile, Sconza); and*

4 *Clinic for Ruminants, University of Munich (Lorenz, Klee).*

5 *Reprint requests: prof. Arcangelo Gentile, Veterinary Clinical Department, University of*

6 *Bologna, via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano Emilia – Bologna, Italy; email:*

7 arcangelo.gentile@unibo.it

8

9 **Short title**

10 Systemic acidosis in calves

11 **Abstract**

12 BACKGROUND:

13 Among the various metabolic disturbances occurring in calves affected by neonatal diarrhea or
14 by ruminal acidosis, systemic acidosis constitutes an important condition requiring a specific
15 therapy. Although various attempts have been made to estimate the degree of acidosis on the
16 basis of clinical signs, some doubts have been raised about the accuracy and the predictive value
17 of the suggested clinical parameters. Recent observations have shown that some of the clinical
18 signs once attributed to metabolic acidosis seem to be due to hyper-D-lactatemia and not to
19 systemic acidosis.

20 HYPOTHESIS:

21 The aim of this study was to investigate the occurrence of clinical findings in experimentally
22 induced systemic acidosis.

23 ANIMALS:

24 The study was carried out on 15 Holstein male calves, aged between 5 and 19 days of live.

25 METHODS:

26 Hyperchloremic metabolic acidosis without the addition of organic acids was obtained by
27 intravenous infusion of 4000 ml of a 0.1M hydrochloric acid solution over a period of 80
28 minutes.

29 RESULTS:

30 Acidemia occurred rapidly and increased constantly up to a maximum value which was reached
31 in all calves by the end of the administration and amounted to a 22.4 mmol/liter mean base
32 deficit (range from 17.0 to 33.1 mmol/l base deficit).

33 Despite the relatively severe acid-base imbalance during the entire observation period, no calves
34 showed any clinical signs; even appetite remained normal.

35 **CONCLUSIONS AND CLINICAL IMPORTANCE:**

36 The results confirm that factors other than a disturbance of the acid-base balance should be
37 considered to be primarily responsible for the clinical picture in calves affected by diarrhea or
38 ruminal acidosis.

39

40 **Key words**

41 Acid-base; D-lactate; Hydrochloric acid; Diarrhea; Ruminal acidosis; Clinical findings.

42 In calves affected by neonatal diarrhea (1) or by ruminal acidosis due to ruminal drinking (2, 3),
43 dehydration, metabolic acidosis, electrolyte imbalance, hypoglycemia, hyper-L-/D-lactatemia
44 and hypothermia constitute the most important metabolic disturbances. Among them,
45 dehydration and metabolic acidosis also represent the main conditions requiring a specific
46 therapy (4).

47 In order to guide fluid replacement and restoration of the physiologic acid-base balance,
48 accurate and objective guidelines are necessary to assess the degree of the associated metabolic
49 disturbances. Reliable clinical tests (skin elasticity and position of the eyeballs) (5) enable the
50 clinician to satisfactorily estimate the degree of dehydration. Although various attempts have
51 been made to estimate the severity of acidosis on the basis of clinical signs, some doubts have
52 recently been raised about the validity of the clinical parameters suggested (6). Disturbance of
53 posture and/or behavior (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) and the impairment of the sucking reflex (11,
54 14) have been suggested as being correlated to systemic acidosis.

55 Recent observations on calves with naturally acquired diarrhea have shown that changes in
56 demeanor and in posture seem to be better explained by an increase in serum D-lactate
57 concentrations than by a decrease in base excess (14). In confirmation of these observations
58 experimentally-induced hyper-D-lactatemia without acidosis managed to reproduce some
59 clinical findings once attributed to systemic acidosis, such as somnolence and staggering gait
60 (15). In particular, disturbances of the palpebral reflexes appeared to be strongly correlated to
61 high levels of D-lactatemia. On the other hand, no impairment of the sucking reflex was
62 observed as a consequence of hyper-D-lactatemia.

63 However, other authors (16) have also demonstrated that D-lactate can produce acutely severe
64 and wide ranging neurological disturbances (4). By comparing the effects of the infusion of DL-

65 lactic acid, L-lactic acid and hydrochloric acid, respectively, on neurological functioning, they
66 concluded that D-lactic acid may have a direct neurotoxic effect on the brain which is
67 independent of acidosis. Their results were supported by the observation that D-lactate
68 penetrates into the cerebro-spinal fluid space with concentrations similar to those in serum. D-
69 lactic acidosis accompanied by neurological symptoms has already been described in human
70 patients affected by the so-called Short Bowel Syndrome (SBS) (17). In this condition, as a
71 consequence of surgical resection of parts of the small intestine, large amounts of undigested
72 easily fermentable carbohydrates reach the colon where they are fermented by colonic bacteria
73 to short chain fatty acids and to D- and L-lactic acid. The intestinal absorption of these acids is
74 responsible for the systemic acidosis. Due to a relatively slow metabolism, D-lactate
75 accumulates in the blood and characterizes metabolic acidosis associated with an elevated anion
76 gap (18).

77 Pathogenetical similarities between SBS and bovine acute ruminal lactic acidosis (both in adult
78 cattle and in milk-fed calves) were demonstrated in the 1990s (19, 20), with the colon of man
79 and the bovine rumen as fermentation chambers and, therefore, responsible for the D-lactic acid
80 overload. Soon afterwards, hyper-D-lactatemia in calves was suggested to be of intestinal origin,
81 such as in cases of bacterial fermentation processes in osmotic diarrhea (21), supporting
82 previous observations of massive fecal excretion of D-lactate in calves affected by diarrhea (22).
83 The contribution of D-lactate to metabolic acidosis in diarrheic calves was subsequently
84 confirmed by other authors (6, 23, 24).

85 The aim of this study was to investigate clinical findings in experimentally-induced systemic
86 acidosis and, therefore, to elucidate the role of the acid-base imbalance in the development of
87 clinical manifestations in calves suffering from diarrhea or ruminal acidosis.

88 **Materials and Methods**

89 The study was carried out at the Faculty of Veterinary Medicine – University of Bologna under
90 the supervision of the local “Centralised Veterinary Service for the Welfare of Experimental
91 Animals” and with the approval of the “Ethical Review Committee of Animal Experimentation”
92 of the University of Bologna.

93 Fifteen healthy Holstein-Friesian male calves, kept in a free housing system with straw bedding,
94 and fed 1.5 liter milk replacers using nipple pails at 0800, 1300 and 1800 h were included in this
95 study. Their age on the day of the experiment ranged between 5 and 19 days (11.2 ± 3.6 days)
96 and their weight between 25 and 52 kg (40.8 ± 8.5 kg). The calves had been acclimated to their
97 environment for at least a couple of days and, in this period, they had both normal appetite and
98 normal feces.

99 After having fasted for a period of at least 6 hours, the calves were fitted with two intravenous
100 catheters (FEP radio-opaque, non pyrogenic, G14 [2.0 x 70 mm]; Delta Med Medical Services)
101 each inserted into a jugular vein. The puncture sites had been clipped and scrubbed for aseptic
102 placement.

103 Metabolic acidosis was obtained by intravenous infusion of 4000 ml of a 0.1M hydrochloric
104 acid solution (for a total of 400 mmol/l) over an injection period of 80 minutes, corresponding to
105 an infusion speed of 50 ml/min (5 mmol/min). The solution was prepared by adding 100 ml of a
106 1M hydrochloric acid solution to 900 ml of a 0.9% NaCl solution; after having been warmed,
107 the solution was injected monolaterally. The controlateral jugular vein was used for the
108 collection of blood samples before the beginning of the injection (T0), at 20 minutes intervals
109 during the infusion period (T20, T40, T60, T80) and then at various intervals after the end of
110 infusion: T90, T100, T110, T120, T130, T140, T150, T180, T210, T270, T390.

111 The intravenous catheter used for collecting the blood was rinsed by the aspiration and re-
112 injection of blood for 30 seconds before each sampling.

113 Clinical conditions were checked before and at short intervals during and after the injection,
114 with the period of observation prolonged until the last blood sample (T390). Special attention
115 was paid to changes in posture, behavior and to the palpebral and sucking reflexes. Immediately
116 after the end of the infusion, the calves were set free from the halter restraint and allowed to
117 walk or to run on a lawn. Then, they were offered their meal (1.5 liter of milk replacer) using
118 nipple pail. Behavior, gait and appetite, as well as milk consumption, were recorded.

119 Heparinized blood samples were immediately examined for blood gases (ABL 700, Radiometer,
120 Copenhagen, Denmark) to assess any changes in acid-base status which might have been
121 responsible for any clinical signs. The following parameters were determined: pH, pCO₂,
122 [HCO₃⁻] and Base Excess (BE). In the same heparinized sample, concentrations of L-lactate,
123 sodium (Na⁺), potassium (K⁺) and chloride (Cl⁻) were also determined (ABL 700, Radiometer).

124 The anion gap value was calculated as follows: $([Na^+] + [K^+]) - ([Cl^-] + [HCO_3^-])$.

125 The concentrations of D- and L-lactate were determined in blood samples which were
126 centrifuged immediately, and the plasma was stored at -20° C until analysis (spectrophotometric
127 method) (25).

128 The data are presented as mean values ± SD. Simple linear regression analysis was used to test
129 the relationship between BE and the weight of the calves at T80.

130 **Results**

131 The infusion of 4000 ml of a 0.1M hydrochloric acid solution induced systemic acidosis in all
132 calves. Figure 1 shows the means of the base excess value (BE) and, thus, the course of the acid-
133 base disturbance. The BE value began at 3.9 ± 2.9 mmol/l and reached its maximum deviation (-
134 22.4 ± 4.9 mmol/l; with a range from -17.0 to -33.1 mmol/l) at the end of the programmed 80
135 minutes of infusion. The wide range was attributed to the different weights of the calves
136 (negative correlation between weight and BE value, $p < 0.05$, $r = 0.534$).

137 Despite the relatively severe acidemia, all calves remained completely healthy during the entire
138 observation period (T0 – T390), including the calf which set the BE record of -33.1 mmol/l.
139 After having been set free from the restraint at the end of the infusion, they all showed normal
140 physiological behavior and demonstrated appetite running toward the bucket of the milk
141 replacer. The ration offered was suckled readily and vigorously. A more in-depth neurological
142 examination confirmed – among other things - physiological suckle and palpebral reflexes.

143 Figures 2 and 3 depict the unexpected “healthy look” of two calves (BE -33.1 and -29.4 mmol/l
144 respectively) immediately after the end of the infusion.

145 Polyuria (not quantified by total collection of urine) was observed in all calves as a consequence
146 of the fluid load.

147 With regard to the electrolyte balance, the acid-base disturbance was accompanied by a parallel
148 increase in blood chloride content while sodium and potassium concentrations always remained
149 in the normal range, the latter indicating the lack of a substantial “cation shift” in the face of an
150 extracellular hydrogen load. In addition, an increase in the blood concentration of calcium ions
151 was detected.

152 The condition of pure hyperchloremic metabolic acidosis without increase of organic acids was
153 confirmed by determination of the anion gap which never deviated from the physiological range.
154 Plasma L-lactate concentration as well as D-lactate concentration also remained in the
155 physiological range.

156 **Discussion**

157 Although empirical guidelines have been widely suggested to predict metabolic acidosis in
158 calves affected by diarrhea or by ruminal acidosis, our results confirm the doubts which specific
159 clinical findings can be used to accurately estimate the degree of the acid-base disturbance. This
160 is supported by the fact that experimentally-induced, non-complicated acidemia was not able to
161 induce any clinical signs, at least under the experimental condition of an intravenous
162 hydrochloric acid infusion in healthy calves.

163 The total acid load of 400 mmol, over a period of 80 minutes (corresponding to 5 mmol/min)
164 caused systemic acidosis, the level of which can be considered medium to severe if compared to
165 naturally occurring metabolic acidosis, secondary to diarrhea or ruminal acidosis.

166 In naturally affected animals, factors other than a simple deviation of the acid-base balance
167 should therefore be considered to be primarily responsible for general health impairment and
168 appearance of clinical findings; dehydration, prerenal azotemia, hyperlactatemia, hyponatremia,
169 hyperkalemia, hypoglycemia, endotoxemia and sepsis are mechanisms which are potentially
170 responsible.

171 Of these mechanisms, the role of D-lactate in the development of clinical disease has been
172 definitively verified (14, 15, 16, 4). The correlation between D-lactate concentrations and base
173 excess found in diarrheic calves (6) is the most probable reason for the fact that most studies on
174 clinical signs in acidosis revealed an influence of acidosis especially on posture and behavior (7,
175 8, 9, 10, 11, 12, 13).

176 The role of L-lactate has to be questioned; in fact, experimentally-induced hyper-L-lactatemia
177 did not provoke clinical disturbances in healthy calves (Lorenz and Gentile, in preparation).

178 In the case of diarrhea, other factors which might influence the general state of calves are the
179 organic and functional alterations at the level of the intestinal tract itself, such as inflammation,
180 spastic or clonic hypermotility and wall distension. In calves with ruminal acidosis, organic
181 alterations at the level of the forestomachs, such as necrotizing ruminitis/omasitis, and of the
182 abomasum, e.g. hemorrhagic abomasitis (26), may play a role in inducing clinical distress.

183 The hydrochloric acidosis protocol used in this study produced severe hyperchloremic metabolic
184 acidosis with no changes in other electrolytes such as potassium or sodium. As evidenced by the
185 unchanged anion gap, the acid-base disturbance was not influenced by an organic acid load as
186 commonly occurs.

187 The lack of a hyperkalemic response in our experiment can be explained by the limited period of
188 persistence of the acid-base imbalance. In an experiment with hydrochloric acid-induced
189 metabolic acidosis (an experiment performed on dogs), the preferential utilization of an
190 extracellular buffer was observed in the initial phase (27), with the contribution of intracellular
191 buffers becoming more important in the latter part of the experiment (as the acidosis increased).
192 On the basis of this interpretation, in our experiment, the time-limited acid load could have been
193 completely buffered in the extracellular space, without requiring additional intracellular
194 buffering. Thus, the exchange of unbuffered hydrogen ions with sodium and especially
195 potassium from the intracellular space may therefore not have been necessary.

196 In the only study somewhat comparable to this experiment (16), a loss of the suckle reflex
197 was correlated to the degree of hydrochloric acid-induced metabolic acidosis. On the basis of this
198 observation the possibility that acidemia may be directly toxic to some regions of the brain is an
199 open question (4). This may be particularly true in chronic acidemia where there is more time
200 for the cerebro-spinal fluid and serum pH to equilibrate (4).

201

202 Conclusion

203 On the basis of the results presented, it was concluded that simple systemic acidosis does not
204 significantly induce clinical repercussion. Hence the validity of clinical findings proposed for
205 estimating the degree of acid-base imbalance in calves affected by diarrhea or by ruminal
206 drinking should be re-evaluated critically.

207 The maintenance of good health in our animals regardless of the relatively severe systemic
208 acidosis confirms that factors other than a deviation of the acid-base balance should be
209 considered to be primarily responsible for the disturbance of the general health usually observed
210 in animals affected by spontaneous diarrhea or ruminal acidosis. Similarly to D-lactate whose
211 role of which in the production of clinical distress has been already confirmed, the involvement
212 of other factors should be the object of further clinical and pathogenetical studies.

213

214 References

215 1. Naylor JM. Severity and nature of acidosis in diarrheic calves over and under one week of
216 age. Can Vet J 1987; 28:168-173.

217

218 2. Gentile A, Rademacher G, Seeman G, Klee W. Systemische Auswirkungen der
219 Pansenazidose im Gefolge von Pansentrinken beim Milchkalb. Tierärztl Prax 1998; 26(G):205-
220 209.

221

- 222 3. Gentile A, Sconza S, Lorenz I, Otranto G, Rademacher G, Famigli Bergamini P, Klee W. D-
223 lactic acidosis in calves as a consequence of experimentally induced ruminal acidosis. J Vet
224 Med A 2004; 51:64-70.
- 225
- 226 4. Naylor JM, Zello GA, Abeysekara S. Advances in oral and intravenous fluid therapy of
227 calves with gastrointestinal disease. Proceedings 24th World Buiatric Congress, October 15-19-
228 2006, Nice, France, 139-150.
- 229
- 230 5. Constable PD, Walker PG, Marin DE, Foreman JH. Clinical and laboratory assessment of
231 hydration status of neonatal calves with diarrhea. J Am Vet Med Ass 1998; 212: 991-996.
- 232
- 233 6. Lorenz I. Influence of D-lactate on Metabolic Acidosis and on Prognosis in Neonatal Calves
234 with Diarrhoea. J Vet Med A 2004; 51:425-428.
- 235
- 236 7. Kasari T R, Naylor JM. Metabolic acidosis without clinical signs of dehydration in young
237 calves. Can Vet J 1984; 25:394-399.
- 238
- 239 8. Kasari TR, Naylor JM. Clinical evaluation of sodium bicarbonate, sodium L-lactate, and
240 sodium acetate for the treatment of acidosis in diarrheic calves. J Am Vet Med Ass 1985;
241 187:392-397.
- 242

- 243 9. Kasari TR, Naylor JM. Further studies on the clinical features and clinico-pathological
244 findings of a syndrome of metabolic acidosis with minimal dehydration in neonatal calves. Can
245 J Vet Res 1986; 50:502-508.
- 246
- 247 10. Naylor JM. A retrospective study of the relationship between clinical signs and severity of
248 acidosis in diarrheic calves. Can Vet J 1989; 30:577-580.
- 249
- 250 11. Geishauser T, Thünker B. Metabolische Azidose bei neugeborenen Kälbern mit Durchfall –
251 Abschätzung an Saugreflex oder Stehvermögen. Prakt Tierarzt 1997; 78:600-605.
- 252
- 253 12. El-Sebaie AH, Sadiq AH, Aref NM. Field approach to neonatal calf diarrhea: I.
254 Relationship between the clinical signs and severity of acidosis. Proceedings of the 5th Scientific
255 Congress of the Egyptian Society for cattle Diseases, Assiut, Egypt, 27-34.
- 256
- 257 13. Wendel H, Sobotka R, Rademacher G. Untersuchungen zur klinischen Abschätzung des
258 Azidosegrades bei Kälbern mit Neugeborenendurchfall. Tierärztl Umschau 2001; 56:351-356.
- 259
- 260 14. Lorenz I. Investigations on the influence of serum D-lactate levels on clinical signs in calves
261 with metabolic acidosis. Vet J 2004; 168:323-327.
- 262
- 263 15. Lorenz I, Gentile A, Klee W. Investigations on D-lactate metabolism and on the clinical
264 signs of D-lactataemia in calves. Vet Rec 2005; 156:412-415.
- 265

- 266 16. Zello GA, Abeysekera AWAS, Wassef AWA, Naylor JM. Evidence for D-lactic acid as
267 neurotoxic agent in acidotic diseases. *S Afr J Nutr* 2005;(Suppl. 1), 291.
268
- 269 17. Oh MS, Phelps KR, Traube M, Barbosa-Saldivar JL, Boxhill C, Carroll HJ. D-lactic acidosis
270 in a man with the short-bowel syndrome. *N Eng J Med* 1979; 301:249-252.
271
- 272 18. Uribarri J, Oh MS, Carroll HJ. D-lactic acidosis – A review of clinical presentations,
273 biochemical features, and pathophysiologic mechanisms. *Medicine* 1998; 77:73-82.
274
- 275 19. Anonymous. The Colon, the rumen, and D-lactic acidosis (Editorial). *Lancet* 1990; 336:559-
276 600.
277
- 278 20. Gentile A, Rademacher G. Vergleichende Betrachtungen der Veränderungen des Säure-
279 Basenhaushaltes bei der Pansenazidose des Rindes und beim sogenannten Kurzdarmsyndrom
280 des Menschen. Proceedings 10th Magyar Buiatrikus Kongresszuz Közèp-Európai Buiatrikus
281 Találkozó, Middle European Buiiatrics Congress, 21-23/05/1998, Siófok, Ungary, 47-51.
282
- 283 21. Grude T, Lorenz I, Rademacher G, Gentile A, Klee W. Levels of D-and L-lactate in rumen
284 liquid, blood, and urine in calves with and without evidence of ruminal drinking. Proceedings
285 32nd Annual Convention AABP, 23-26/09/1999, Nashville, Tennessee (USA), 213-214.
286
- 287 22. Doll K. Untersuchungen über die Bedeutung unspezifischer Faktoren in der Pathogenese der
288 Diarrhoe beim Kalb. Doctoral Thesis, Habilitationschrift 1992, University of Munich, Germany.

- 289
- 290 23. Omole OO, Nappert G, Naylor JM, Zello GA. Both L- and D-lactate contribute to metabolic
291 acidosis in diarrheic calves. *J Nutr* 2001; 131:2128-2131.
- 292
- 293 24. Ewaschuk JB, Naylor JM, Zello GA. D-Lactate in Human and ruminant metabolism. *J Nutr*
294 2005; 135:1619-1625.
- 295
- 296 25. Lorenz I, Hartmann I, Gentile A. Determination of D-lactate in calf serum samples – an
297 automated enzymatic assay. *Comp Clin Path* 2003; 12:169-171.
- 298
- 299 26. Gentile A, Rademacher G, Klee W. Acidosi ruminale fermentativa nel vitello lattante. *Ob*
300 *Doc Vet* 1997; 18(12):63-75.
- 301
- 302 27. Schwarz W, Ørning KJ, Porter R. The internal distribution of Hydrogen ions with varying
303 degrees of metabolic acidosis. *J Clin Invest* 1957; 36:373-382.

304 **Legends**

305 **Fig. 1.** BE values before (T0), during (80 minutes) and after the infusion of a 0.1M HCl solution
306 (50 ml/min).

307 **Fig. 2.** One of the calves has just been set free after the end of the infusion; despite the severe
308 acidosis (BE: -33.1 mmol/l) and “happy” to have been released from the constriction, it runs
309 free in the meadow.

310 **Fig. 3.** Another calf has just been set free after the end of the infusion; finally, it can satisfy its
311 hunger which was not influenced by the severe acidosis (BE: -29.4 mmol/l).

312 **Video 1.** One of the calves (Fig. 2) has just been set free after the end of the infusion; despite the
313 severe acidosis (BE: -33.1 mmol/l) and “happy” to have been released from the constriction, it
314 runs free in the meadow.

315 **Video 2.** Another calf (Fig. 3) has just been set free after the end of the infusion; finally, it can
316 satisfy its hunger which was not influenced by the severe acidosis (BE: -29.4 mmol/l).

317

318

319

