



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacological Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yphrs

Funzione cognitiva e comportamento nelle pecore a cui siano stati inoculati ripetutamente vaccini contenenti adiuvanti di alluminio o soltanto adiuvante di alluminio

Javier Asín^{a,1}, María Pascual-Alonso^{b,1}, Pedro Pinczowski^a, Marina Gimeno^a, Marta Pérez^{c,d}, Ana Muniesa^{a,d}, Lorena de Pablo-Maiso^e, Ignacio de Blas^{a,d}, Delia Lacasta^{a,d}, Antonio Fernández^{a,d}, Damián de Andrés^e, Gustavo María^{b,d}, Ramsés Reina^{e,2}, Lluís Luján^{a,d,1,2}

^a DEPARTMENT of ANIMAL PATHOLOGY, University of ZARAGOZA, SPAIN

^b DEPARTMENT of ANIMAL Production AND Food Science, University of ZARAGOZA, SPAIN

^c DEPARTMENT of ANATOMY, Embryology AND ANIMAL Genetics, University of ZARAGOZA, SPAIN

^d Instituto UNIVERSITARIO de INVESTIGACIÓN Mixto AGROALIMENTARIO de ARAGÓN (IA2), University of ZARAGOZA, SPAIN

^e Institute of Agrobiotechnology, CSIC-Public University of NAVARRA, MUTILVA BAJA, NAVARRA, SPAIN

ARTICLE INFO

Keywords:

Aluminum
Vaccine
Sheep
Behavior
Ovine ASIA syndrome

ABSTRACT

I vaccini contenenti alluminio (Al)- sono comuni nella gestione delle pecore e sono stati associati con la Sindrome autoimmune/infiammatoria indotta da adiuvanti (sindrome di ASIA).

Lo scopo di questo studio è quello di indagare i cambiamenti cognitivi e comportamentali in pecore sottoposte ad un protocollo di inoculazione ripetitiva con prodotti contenenti Al.

Ventuno agnelli sono stati assegnati a tre gruppi (n = 7 ciascuno): A (Controllo), B (solo adiuvante), C (Vaccino). Il gruppo C è stato inoculato con vaccini commerciali contenenti Al; il gruppo B ha ricevuto la dose equivalente di solo Al (Alhydrogel®) e il Gruppo A ha ricevuto il PBS. Sono state somministrate sedici inoculazioni. in un periodo di 349 giorni.

Cambiamenti etologici sono stati studiati in tarda estate (7 inoculazioni) e metà inverno (16 inoculazioni). Gli animali dei gruppi B e C hanno mostrato cambiamenti comportamentali: le interazioni di affiliazione sono state significativamente ridotte e le interazioni aggressive e le stereotipie sono aumentate in modo significativo.

Hanno anche esposto un significativo aumento del comportamento eccitatorio e del comportamento nutritivo compulsivo. In generale, i cambiamenti sono stati più pronunciati nel gruppo vaccinato che nel gruppo inoculato di soli adiuvanti. Alcuni cambiamenti erano già significativi in estate, dopo solo le sette inoculazioni. Questo studio è il primo a descrivere i cambiamenti comportamentali nelle pecore dopo aver ricevuto ripetute e ripetitive iniezioni di prodotti contenenti Al, spiegando alcuni dei segni clinici osservati nella sindrome di ASIA degli ovini.

1. Introduzione

I vaccini hanno contribuito in modo significativo alla salute globale [1]. In medicina veterinaria, i vaccini hanno contribuito all'eradicazione di malattie infettive come la peste bovina [2] e alla produzione di alimenti di qualità di origine animale [3]. Spesso i vaccini sono abbinati ad un adiuvante che aumenta l'efficacia del vaccino promuovendo una reazione immunitaria rapida, duratura ed efficace contro l'antigene [4]. I sali di alluminio (Al) sono uno dei coadiuvanti vaccinali più utilizzati perché forniscono prestazioni insuperabili e sono poco costose [5]. In generale, i vaccini sono considerati ragionevolmente sicuri [6], e ciò ha portato alla percezione che i benefici dell'immunizzazione superano di molto i rischi, anche se gli effetti avversi si verificano occasionalmente [7].

Tuttavia, l'uso di Al come coadiuvante ha suscitato controversie nei recenti anni: alcuni ricercatori hanno sostenuto che, con l'eccezione di alcune reazioni acute locali, Al non presenta alcun rischio per la salute

[8,9], ma altre hanno segnalato una serie di effetti avversi, e hanno chiesto ulteriori informazioni e ricerche sull'argomento [10,11].

In medicina veterinaria, in particolare per gli animali da allevamento, vengono spesso effettuate campagne di vaccinazione per controllare le malattie infettive emergenti o riemergenti [12]. Tra il 2007 e il 2010, in Europa sono state intraprese diverse campagne di vaccinazione contro il virus della febbre catarrale degli ovini (BT). [13]

La BT è una malattia sistemica virale, non zoonotica, trasmessa dagli insetti dei ruminanti, che causa gravi problemi sanitari ed economici ed è particolarmente dannosa per le pecore [14]. Storicamente, la vaccinazione è stata la via più efficace di controllare la BT [14]. Fino all'ultimo decennio, i vaccini BT contenevano virus vivo attenuato che poteva causare effetti deleteri come malformazioni fetali o anche il riemergere della BT. [15,16].

¹ Corresponding author at: Department of Animal Pathology, University of Zaragoza, Spain

E-MAIL ADDRESS: Lluís.Lujan@unizar.es (L. Luján).

¹ These authors contributed equally to this work.

² These authors also contributed equally to this work.

Tabella 1

I vaccini commerciali utilizzati nell'esperimento per inoculare agnelli nel gruppo C. Il contenuto di alluminio è stato misurato mediante spettrometria di emissione atomica al plasma ad accoppiamento induttivo ed è espresso per dose..

Vaccino	Nome commerciale	Produttore	Antigene	dpi*	mg of Al#/dose
1	Heptavac P Plus	MSD Animal Health S.L.	<i>PASTEURELLA MULTOCIDA</i> , <i>MANNHEIMIA HAEMOLYTICA</i> , <i>Clostridium spp.</i>	0, 23, 233	7.5
2	Autogenous vaccine	Exopol	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> spp. <i>ANAEROBIUS</i>	44, 69	1.644
3	Vanguard R	Zoetis	Virus della Rabbia	98	1.025
4	Agalaxipra	Hipra	<i>MYCOPLASMA AGALACTIAE</i>	129, 146	6.764
5	Ovivac CS	Hipra	<i>CHLAMYDOPHILA ABORTUS</i> , <i>SALMONELLA ABORTUS ovis</i>	209, 233	5.6
6	Autogenous vaccine	Exopol	<i>CORYNEBACTERIUM pseudotuberculosis</i>	254, 272	1.32
7	Bluevac-1	CZ Veterinaria S.A.	Bluetongue virus serotype 1	293, 329	4.18
8	Bluevac-4	CZ Veterinaria S.A.	Bluetongue virus serotype 4	293, 329	4.16

*: dpi: giorni successivi alla prima inoculazione.

#: Al: Alluminio.

Dal 2007, i vaccini utilizzati in Europa hanno contenuto virus inattivato e idrossido di Al come adiuvante [17,18]. Entro il 2008, in Spagna, diversi sierotipi circolavano contemporaneamente e, tipicamente, due sierotipi predominanti in una determinata zona geografica [19].

In risposta, in tutto il paese, è stato attuato un doppio programma di vaccinazione che comprendeva due vaccini contro i due sierotipi che circolavano in ogni area. Gli animali hanno ricevuto quattro dosi di vaccino entro circa un mese, che è culminato in un inoculo di 16 mg di Al per animale. Dopo queste vaccinazioni, è stata identificata una sindrome non segnalata in precedenza [20,21], caratterizzata da una fase acuta che comprendeva gravi sintomi neurologici con lesioni di meningoencefalite sterile, e una fase cronica che ha coinvolto una estrema perdita di peso e lesioni neurodegenerative nel midollo spinale. La fase cronica è correlata alle basse temperature ambientali. Tutte le malattie ovine conosciute sono state escluse come causa della sindrome, e si è concluso che il processo è stato associato con l'uso di vaccini contenenti Al-adjutant alluminio come coadiuvante, ed è stato incluso sotto l'ombrello della sindrome autoimmune/infiammatoria indotta da adiuvanti (sindrome di ASIA) [21,22]. Nella fase cronica, le pecore hanno mostrato una varietà di cambiamenti comportamentali compresi periodi di depressione (ad esempio, mancanza di risposta agli stimoli, stupore) e la letargia che si mescolavano con periodi di eccitazione, irrequietezza, polifagia, e aumento dell'aggressività specialmente il mordere compulsivo la lana tra gli animali. Alcuni di questi cambiamenti comportamentali sono stati riprodotti in una piccola coorte di agnelli ripetutamente vaccinati, ma essi non erano pienamente caratterizzati [21]. Cambiamenti comportamentali simili sono stati osservati in animali da laboratorio sperimentali che sono stati inoculati con adiuvanti Al [23].

Diversi test validati sono stati utilizzati per valutare i cambiamenti comportamentali e cognitivi nelle pecore. Osservazioni home pen sono state utilizzate per quantificare i comportamenti sociali e individuali [24-27], mentre T-maze test, Open Field Test (OFT), e il Novel Object test (NOT) sono stati usati per valutare aspetti specifici della cognizione. Il test T-maze è stato validato come mezzo di studio di vari aspetti dell'apprendimento spaziale e della memoria di lavoro nelle pecore [28-31], l'OFT è stato utilizzato per valutare la risposta di un animale ad un ambiente nuovo e l'isolamento dai compagni di gregge [28,32,33], e NOT è stato applicato per quantificare il numero di reazioni di paura delle pecore [34,35]. Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare i cambiamenti comportamentali e cognitivi nelle pecore ripetutamente inoculate con Vaccini contenenti adiuvante in Al o solo adiuvante in Al.

2. Materiali e metodi

2.1. Progettazione sperimentale

Tutte le procedure sperimentali sono state approvate e concesse in licenza dal Comitato Etico dell'Università di Saragozza (rif. PI15/14). I Requisiti della politica spagnola per la protezione degli animali (RD53/2013) e la Direttiva dell'Unione Europea 2010/63 sulla protezione degli animali da esperimento sono sempre state rispettate.

Lo studio è stato effettuato presso la fattoria di ricerca sperimentale dell'Università di Saragozza. 2

Ventuno agnelli non vaccinati, castrati, maschi purosangue di razza Rasa Aragonesa sono stati selezionati a 3 mesi di età da un gregge di pedigree di buona salute certificata e assegnato a uno dei tre gruppi di sette animali ciascuno. Gruppo A (Controllo) è stato inoculato con PBS, il Gruppo B (solo adiuvante) è stato inoculato con il solo adiuvante, e il Gruppo C (Vaccino) è stato inoculato con vaccini commerciali che contenevano Al come coadiuvante. L'esperimento si è svolto da Feb 2015 a Feb 2016 (349 giorni), che comprendeva un'estate piena e un periodo invernale.

2.2 Gestione degli animali

Le condizioni di ricovero e di gestione e la dieta erano identiche per tutti gli animali. I tre gruppi erano isolati l'uno dall'altro, ma occupavano recinti contigui e identici all'interno dello stesso edificio. I recinti erano stanze rettangolari chiuse, 7 x 3,5 x 6 m (lunghezza x larghezza x altezza), aperte all'esterno dell'edificio in una delle pareti corte attraverso quattro finestre chiudibili. La razione giornaliera era di 1 kg di concentrato per animale, paglia e acqua ad libitum. Il Concentrato (Agrovec®), Saragozza, Spagna) conteneva il 15,7% di proteine grezze, il 3,9% di grassi grezzi, il 10,4% di fibre grezze, il 9,5% di ceneri grezze, 0,22% di sodio e adeguate proporzioni di integratori minerali e vitaminici per gli agnelli in crescita.

Ogni giorno alle 0830 h, il concentrato è stato offerto da una tramoggia lunga 2 metri che aveva due aperture, che permetteva a tutti gli animali di un gruppo di mangiare contemporaneamente. Temperature minime, massime e medie giornaliere nell'ambiente in cui si trovavano gli animali del gruppo, sono stati ottenuti dall'Agenzia Spagnola di Meteorologia (AEMET). La temperatura media giornaliera era di 25,5 °C in estate e di 9,0 °C in inverno.

2.3 Protocollo di vaccinazione

Gli agnelli sono stati sottoposti a un programma di vaccinazione accelerata, volto ad inoculare in un lasso di tempo sperimentale accettabile- un carico di Al equivalente a quello che una pecora in condizioni locali di gestione sul campo riceve di solito lungo 6-7 anni.

Animali del gruppo C (Vaccino) sono stati inoculati con vaccini commerciali contro le principali malattie degli ovini (Tabella 1, Fig. 1), ricevendo 16 dosi di vaccino entro 12 mesi e un totale di 70.861 mg di Al. Le procedure di applicazione raccomandate per ogni prodotto sono sempre state seguite. Animali del gruppo B (solo adiuvante) sono stati inoculati solo con Al-hydroxide (Alhydrogel®, CZ Veterinaria, Spagna), a concentrazioni identiche a quelle del corrispondente vaccino commerciale, misurate mediante spettrometria di emissione atomica plasmatica ad accoppiamento induttivo (Tabella 1). Il gruppo A è stato inoculato con un identico volume di PBS. Tutte le inoculazioni sono state effettuate nel tessuto sottocutaneo dell'area che comprende la scapola, e le costole, con l'uso individuale, siringa e ago sterili monouso per ogni iniezione.

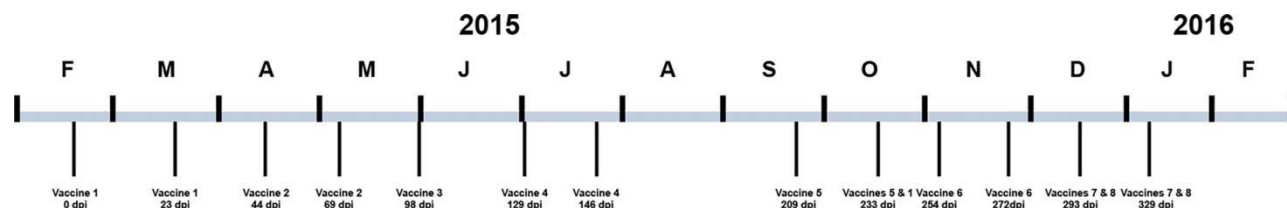


Fig. 1. Programma di vaccinazione. Ogni barra rappresenta una data di inoculazione. In totale, 16 inoculazioni sono stati somministrati in uno dei 13 giorni. dpi: giorni dopo il primo inoculo.

2.4. Valutazioni cognitive e comportamentali

Gli animali sono stati sottoposti a due cicli di ciascuno dei test descritti di seguito. Il primo ciclo è iniziato a 196 giorni dopo la prima inoculazione (dpi), in Settembre 2015 (fine estate). Il secondo ciclo è iniziato a 336 dpi, nel gennaio 2016 (metà inverno; tabella supplementare S1). Nella fase estiva, tutti gli animali sono stati inoculati 7 volte e, nella fase invernale, gli animali sono stati inoculati 16 volte.

2.4.1. Test cognitivo: T-maze

Ogni animale è stato sottoposto alla T-maze test su due giorni consecutivi in estate e in inverno. L'ordine in cui sono stati testati gli agnelli si è alternato tra i tre gruppi e l'ordine è stato mantenuto in tutti i test. I test sono stati eseguiti in un labirinto a T costruito con pannelli di plastica alti 1,4 m, che era stato convalidato per l'uso con gli agnelli [28]. Un indizio a specchio e un altoparlante sono stati collocati a livello del pavimento nella zona target nel braccio sinistro del labirinto, che servivano rispettivamente come indizio sociale e acustico. Ad ogni animale è stato dato fino a 5 minuti per risolvere il labirinto. Le registrazioni video di ogni test sono state ciecamente valutate da un ricercatore addestrato (MPA) e la latenza, il tempo impiegato per raggiungere la zona di destinazione, il tempo speso a risolvere il labirinto, e il numero di aree attraversate è stato ottenuto.

2.4.2. Test cognitivi: Open Field Test (OFT) e Novel Object Test (NOT).

Ogni animale è stato sottoposto all'OFT una volta in ciascuno dei due turni. L'ordine in cui sono stati testati gli agnelli si è alternato tra i tre gruppi e l'ordine è stato mantenuto in tutti i test. L'arena di prova di 4 x 4 m costruita con pannelli di plastica alti 1,40 m, è servita da nuovo ambiente per l'animale che era stato completamente isolato dagli altri agnellini. Acqua e cibo sono stati offerti con un secchio. Ogni animale è stato lasciato nell'arena di prova per 5 min, ed è stato registrato con una videocassetta e un microfono. Dalle registrazioni, l'osservatore (MPA) ha calcolato ciecamente il tempo che l'animale ha trascorso camminando, esplorando, stando in piedi e cercando di fuggire, tra gli altri parametri. Il NOT è stato eseguito nella stessa arena di prova. Una palla di plastica blu è stata abbassata due volte dal soffitto al centro dell'arena e lasciata lì per 1 min. L'osservatore ha registrato la distanza tra l'agnello e la palla dopo 30 secondi, ogni volta.

2.4.3. Test comportamentali: osservazione del comportamento individuale e sociale tramite home pen.

Tutti gli agnelli sono stati identificati individualmente da numeri dipinti sui fianchi e sulla groppa. Per registrare i comportamenti sociali e individuali, una telecamera è stata posizionata nella parte superiore di ogni penna e un videoregistratore (Circontrol S.A.Spagna) è stato installato in una stanza adiacente alle penne. In ciascuno dei due turni, le registrazioni sono state effettuate per 12 ore/giorno (0800 h - 2000 h) su sette giorni consecutivi. Dopo la conclusione dell'esperimento, un ricercatore addestrato (MPA) ha analizzato i video consecutivamente in modo cieco. (blind manner) I dati video sono stati quantificati in due modi: Campionamento istantaneo per i comportamenti individuali e campionamento continuo per i comportamenti sociali. Il campionamento istantaneo ha comportato la quantificazione di 1 minuto da ogni 10 minuti di video, per un totale di 504 minuti per gruppo e 1512 minuti per turno. Il campionamento continuo ha comportato la quantificazione di tre periodi osservazione di 2 ore al giorno. (0800 h - 1000 h, 1200 h - 1400 h - 1400 h e 1600 h - 1800 h) che sono stati complessivamente 42 ore di osservazioni per gruppo e 126 ore per turno.

L'analisi dei comportamenti individuali e sociali ha comportato la documentazione del numero di eventi in cui un animale ha mostrato uno specifico comportamento.

I comportamenti individuali comprendevano l'alimentazione a base di concentrato, mangiare paglia, riposare, stare in piedi, e bere. I comportamenti sociali sono stati assegnati a uno delle tre categorie: i) interazioni di affiliazione, ii) interazioni agonistiche (aggressive) e iii) stereotipie. Testo alternativo: Una descrizione dei comportamenti individuali e sociali valutati è dettagliata nelle Tabelle S2 e S3 supplementari.

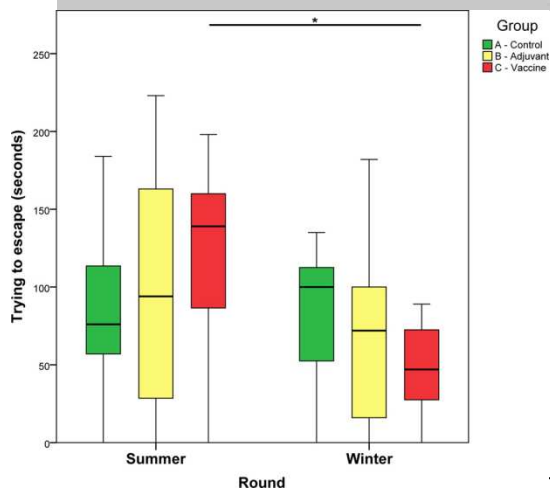
2.5. Pannello ematologico e indicatori di benessere

Un pannello ematologico standardizzato è stato eseguito, e il benessere e gli indicatori di stress quali cortisolo, creatina chinasi (CK), lattato, glucosio, acidi grassi non esterificati (NEFA) e rapporto neutrofili / linfociti (N/L) [36,24,37-39] sono stati misurati il giorno dopo il periodo di registrazione in ciascuno dei due turni, lontano dalla recente manipolazione degli animali (tabella supplementare S1). I campioni di sangue sono stati prelevati alle 0800 h da venipuntura giugulare, che ha richiesto < 1 minuto per agnello. La formula leucocitaria è stata stimata dal sangue con Diff-Quick strisci a macchia rapida. Il rapporto N/L è stato calcolato sulla base di 100 leucociti per campione. La concentrazione di cortisolo (nmol/L) nel plasma è stata misurata con immunodosaggio enzimatico [40].

2.6. Analisi statistica

I confronti sono stati effettuati come segue: T-maze test: Confronti non accoppiati tra gruppi per ciascuno dei due giorni del test in ogni ciclo, e confronti accoppiati all'interno dei gruppi tra i due giorni del test in ogni ciclo. OFT: confronti tra gruppi all'interno di ogni ciclo di test e confronti accoppiati all'interno dei gruppi tra i due cicli. NOT: Confronti non accoppiati tra gruppi per ciascuna delle due distanze dall'oggetto nuovo in ogni round e, all'interno di ogni gruppo, confronti accoppiati tra le due distanze in ogni round. Comportamento: Confronti tra gruppi all'interno di ogni ciclo di test e confronti accoppiati all'interno dei gruppi tra i due cicli, che si limitavano a comportamenti sociali a causa di influenze stagionali sui comportamenti individuali per una normale variazione fisiologica stagionale (ad esempio, tutti i gruppi hanno bevuto più acqua in estate e mangiava più paglia in inverno). Per la maggior parte dei parametri del pannello ematologico e degli indicatori di benessere, confronti non abbinati tra gruppi sono stati eseguiti per ogni round, e all'interno del gruppo sono stati effettuati confronti in coppia tra i round solo per il cortisolo.

Un Shapiro-Wilk's Test è stato utilizzato per confermare se i dati delle variabili quantitative hanno soddisfatto l'ipotesi di normalità. Un test parametrico è stato utilizzato se la variabile ha soddisfatto l'assunzione, e un non parametrico se non l'ha fatto. I confronti non accoppiati sono stati eseguiti utilizzando un test ANOVA (A) (o il test t-test di Welch (We). se le varianze non erano omogenee sulla base di un test di Levene e di un test post hoc di Duncan. (test parametrici), oppure un test di Kruskal-Wallis (KW) e un test post hoc di Dunn (test non parametrico). I confronti in coppia sono stati eseguiti utilizzando lo Student's t (t) test per i campioni dipendenti (test parametrico) o un Test di Wilcoxon (W) (test non parametrico). Modelli lineari generali (GLM) sono stati sviluppati per valutare l'influenza del "Gruppo" e del "Round", e le loro interazioni in coppia sui test comportamentali. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando IBM SPSS 19.0 per Windows (IBM Corp., Armonk, NY, USA). I livelli di alfa e beta sono stati fissati rispettivamente a 0,050 e 0,200.



Gli agnelli del Gruppo C (Vaccino, in rosso) hanno passato meno tempo a cercare di sfuggire all'arena di prova nella prova invernale. (* $p_t = 0,003$). L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando lo Student's test per i campioni dipendenti. Le barre centrali indicano la mediana. Gli estremi delle caselle rappresentano il primo (Q1, inferiore) e il terzo (Q3, superiore) quartile. Le scatole rappresentano l'intervallo interquartile (IQ = Q3-Q1), che indica il 50% dei dati. Le barre whisker sono state calcolate a partire dal Q1 (Q3 superiore + 1,5 x QI; inferiore: Q1 - 1,5 x QI), e riflettono la variabilità dei dati al di fuori del Q1 e del Q3. I dati sono presentati in una Tabella supplementare S14.

2. Risultati

3.1. Test cognitivi

3.1.1. Test del labirinto a T

Non ci sono state differenze significative tra i gruppi in nessuna delle due fasi (estate o inverno). All'interno dei gruppi non ci sono state differenze significative tra i due giorni consecutivi di prove in estate. In inverno, comunque, il Gruppo C ha lasciato la prima area (latenza) significativamente ($p_w = 0,027$) prima il secondo giorno di prove (Tavole Supplementari S4-S11).

3.1.2. OFT e NOT

Né in estate né in inverno i tre gruppi si sono comportati significativamente in modo diverso tra di loro in nessuno dei due test. Nell'OFT in inverno, le pecore del Gruppo B hanno significativamente ($p_w = 0,043$) passato più tempo ad esplorare di quanto abbiano fatto d'estate e le pecore del Gruppo C hanno significativamente ($p_t = 0,003$) passato meno tempo a cercare di scappare (Fig. 2). Nel NOT, d'inverno, le pecore del Gruppo B erano significativamente ($p_w = 0,043$) più distanti dal nuovo oggetto nella seconda esposizione che nella prima esposizione (Tavole Supplementari S12-S19).

3.2. Test comportamentali

3.2.1. Comportamento individuale

D'estate, il Gruppo C ha mangiato paglia (ndt. fieno) significativamente ($p_{kw} = 0,018$) meno di frequente delle pecore del Gruppo A. Le pecore del Gruppo C e B hanno passato significativamente ($p_A < 0,001$) più tempo in piedi delle pecore del Gruppo A. D'inverno, le pecore del Gruppo C e del Gruppo B hanno mangiato concentrato significativamente ($p_{kw} < 0,001$) meno volte delle pecore del Gruppo A. Le pecore del Gruppo B hanno riposato meno spesso ($p_{kw} = 0,027$) delle pecore del Gruppo A e le pecore del Gruppo C e del Gruppo B sono state significativamente più in piedi ($p_A = 0,001$) delle pecore del Gruppo A (Fig. 3) I GLM hanno indicato che l'effetto di interazione tra il "Gruppo" e la "Fase" è stato significativo ($p = 0,035$) per la posizione in piedi (Tavole Supplementari S20-S25).

3.2.2. Comportamento Sociale

D'estate, il livello di interazioni affiliative non è stato diverso tra i gruppi (Fig. 4, Tavola Supplementare S26) ma le pecore dei Gruppi B e C hanno significativamente ($p_{kw} < 0,001$) mostrato più interazioni aggressive (Fig. 5, Tavola Supplementare S27) e stereotipie (Fig. 6, Tavola Supplementare S28) delle pecore del Gruppo A, e le pecore del Gruppo C hanno significativamente ($p_{kw} < 0,001$) mostrato più stereotipie delle pecore del Gruppo B. D'inverno, le pecore del Gruppo C hanno significativamente ($p_{kw} < 0,001$) mostrato meno affiliazioni delle pecore del Gruppo B (Fig. 4, Tavola Supplementare S26). Inoltre, d'inverno, le pecore dei gruppi B e C hanno significativamente ($p_{kw} < 0,001$) meno affiliazioni (Fig. 4, Tavola Supplementare S26), più interazioni aggressive (Fig. 5, Tavola Supplementare S27) e stereotipie (Fig. 6, Tavola Supplementare S28) delle pecore del Gruppo A.

Nei gruppi B e C, la frequenza delle affiliazioni è stata significativamente più bassa (Gruppo B: $p_w = 0,045$; Gruppo C: $p_w < 0,001$; Fig. 4, Tavola Supplementare S26) e la frequenza delle interazioni aggressive è stata significativamente più alta (Gruppo B: $p_w = 0,018$; Gruppo C: $p_w = 0,003$; Fig. 5, Tavola Supplementare S27) d'inverno che d'estate. Nel Gruppo C ($p_w = 0,002$) le pecore hanno significativamente mostrato più stereotipie d'inverno che d'estate (Fig. 6 Tavola Supplementare S28). Nel Gruppo A, quei tre tipi di comportamento non sono stati significativamente diversi tra l'estate e l'inverno (Fig. 4-6). I GLM hanno indicato che l'effetto di interazione tra il "Gruppo" e la "Fase" è stato significativo per le interazioni affiliative ($p = 0,002$) e le interazioni aggressive ($p = 0,024$) (Tavola Supplementare S29). Verso la fine della fase invernale (Febbraio 2016), gli animali del Gruppo C mordevano la lana e 5 su 7 pecore avevano aree multifocali di perdita di lana e depilazione, normalmente sul sedere e al garrese (Supplementare Fig. S1)

3.3. Esame ematologico e indicatori di benessere

D'estate, gli esami ematologici dei tre gruppi non sono stati significativamente diversi. D'inverno, le cellule bianche (WBC; $p_A = 0,047$) e il numero degli eosinofili ($p_{kw} = 0,016$) sono stati più alti nel gruppo C che negli altri due gruppi. D'estate, i livelli di cortisolo non sono stati significativamente diversi tra i gruppi, però, d'inverno, i livelli di cortisolo sono stati significativamente più alti nei gruppi B e C che nel gruppo A ($p_A = 0,005$). Inoltre, nel gruppo A, ma non nei gruppi B e C, i livelli di cortisolo sono stati significativamente ($p_t = 0,002$) più bassi d'inverno che d'estate (Fig. 7) (Tavole Supplementari S30-S31).

4. Discussione

Questo è il primo studio scientifico che studia i cambiamenti cognitivi e comportamentali nelle pecore dopo l'inoculazione di prodotti contenenti alluminio. Dopo le campagne di vaccinazione obbligatoria contro la BT negli ultimi dieci anni, sono stati osservati parecchi cambiamenti di comportamento [20, 21] che hanno dato il via alla ricerca sulla presunta relazione tra iniezioni sottocutanee di vaccini contenenti alluminio e questi cambiamenti. Qua, abbiamo usato un modello sperimentale per dimostrare che le pecore a cui vengono iniettate vaccini con idrossido di alluminio o semplicemente idrossido di alluminio mostrano cambiamenti comportamentali simili a quelli precedentemente segnalati per la sindrome ASIA degli ovini.

Questo esperimento cerca di riprodurre in un breve periodo di tempo gli effetti clinici di inoculazioni consecutive di vaccini. Parecchie vaccinazioni sono somministrate ogni anno alla maggior parte dei greggi come misura preventiva contro una moltitudine di malattie infettive, che a volte prevedono l'uso contemporaneo di più di un vaccino [41]. Inoltre, la maggior parte dei vaccini vengono somministrati a pecore di ogni età, cioè, un capo riceve vaccini durante tutta la sua vita produttiva. Le pecore possono ricevere ulteriori vaccini se, ad esempio, c'è un focolaio di una malattia infettiva segnalabile obbligatoria come un focolaio di BT in Europa [19]. In alcuni greggi, le pecore possono ricevere una media di 2-4 vaccini all'anno e una serie di 14-28 nell'arco di 7 anni. La maggior parte dei vaccini per pecore contiene circa 2 mg Al/ml, la dose normale è 2 ml, e il calendario vaccinale include una prima vaccinazione di due dosi a 3-4 settimane di distanza, seguite da richiami ogni 6-12 mesi.

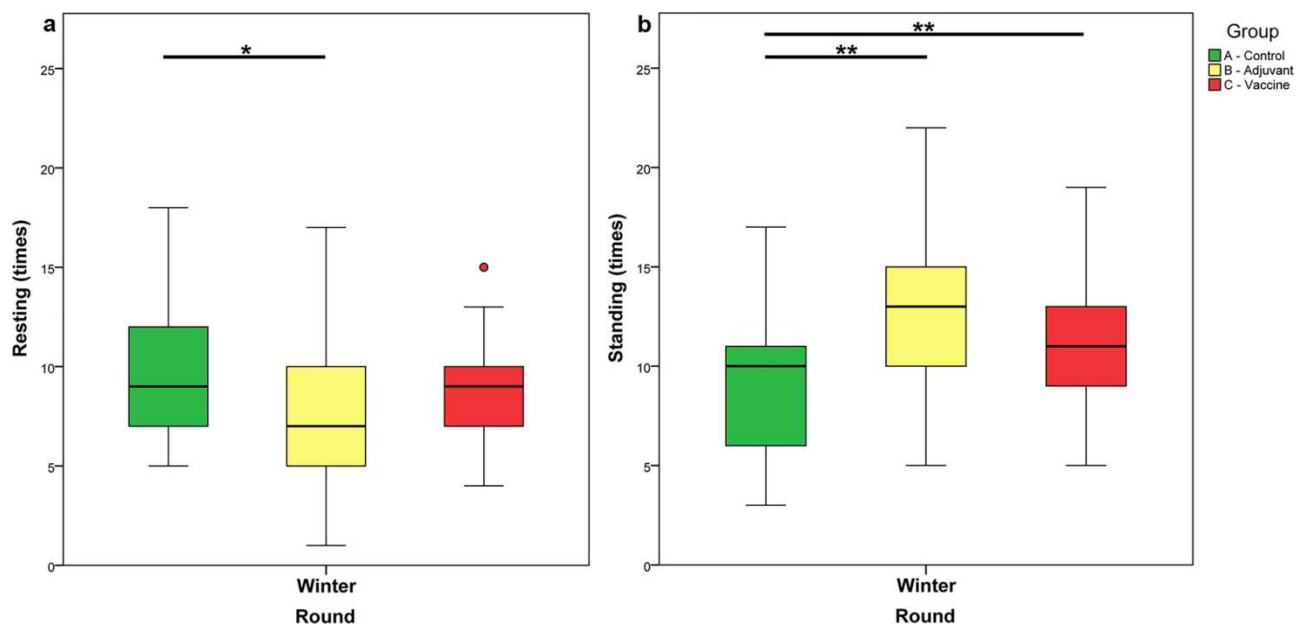


Fig. 3 Comportamento individuale: a riposo (a) e in piedi (b) nella serie invernale dei test.

Agnelli del Gruppo B (solo Adjuvante, giallo) hanno trascorso meno tempo a riposo (* $p_{KW} = 0.027$) rispetto agli agnelli del Gruppo A (Controllo, verde). Agnelli del Gruppo B (solo adjuvante, giallo) e agnelli del Gruppo C (Vaccino, rosso) hanno trascorso più tempo in piedi (** $p_A < 0.001$) rispetto agli agnelli del Gruppo A (Controllo, verde). I confronti statistici sono stati basati sui test Kruskal-Wallis (KW) e post hoc Dunn per il riposo e un test ANOVA e un test post hoc Duncan per il tempo in piedi. Le barre centrali indicano la mediana. Le estremità dei riquadri rappresentano il primo (Q1, inferiore) e il terzo (Q3, superiore) quartile. I riquadri rappresentano l'intervallo interquartile (IQ = $Q3 - Q1$), che rappresenta il 50% dei dati. I diagrammi a scatole e baffi sono stati calcolati dal IQ (superiore: $Q3 + 1.5 \times IQ$; inferiore: $Q1 - 1.5 \times IQ$) e rispecchiano la variabilità dei dati al di fuori di Q1 e Q3. I dati sono presentati nelle tabelle supplementari S22 -S23.

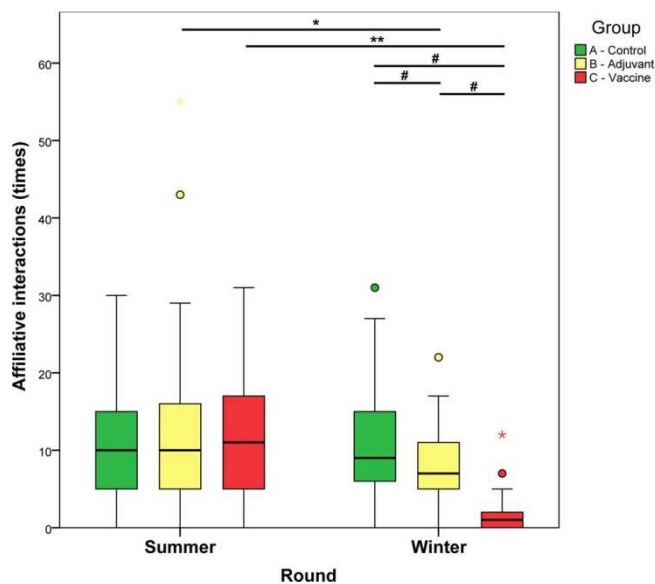


Fig. 4. Comportamento sociale: interazioni affiliative. Il Gruppo B (solo adjuvante, giallo) compie interazioni meno affiliative in inverno (* $p_W = 0.045$). Il Gruppo C (Vaccino, rosso) compie interazioni meno affiliative in inverno (** $p_W < 0.001$). I Gruppi B (solo Adjuvante, giallo) e C (Vaccino, rosso) compiono interazioni meno affiliative rispetto al Gruppo A (Controllo, verde) nel periodo invernale (# $p_{KW} < 0.001$). Inoltre, nel periodo invernale, il Gruppo C (Vaccini) compie interazioni meno affiliative rispetto al Gruppo B (solo Adjuvante, giallo) (# $p_{KW} < 0.001$). Confronti all'interno dei gruppi sono stati fatti attraverso il test Wilcoxon (W). Confronti tra i gruppi sono stati eseguiti dal test Kruskal-Wallis e il test post hoc Dunn. Le barre centrali indicano la mediana. Le estremità dei riquadri rappresentano il primo (Q1, inferiore) e il terzo (Q3, superiore) quartile. I riquadri rappresentano l'intervallo interquartile (IQ = $Q3 - Q1$), che rappresenta il 50% dei dati. I diagrammi a scatole e baffi sono stati calcolati dal IQ (superiore: $Q3 + 1.5 \times IQ$; inferiore: $Q1 - 1.5 \times IQ$) e rispecchiano la variabilità dei dati al di fuori di Q1 e Q3. I dati sono presentati nella tabella supplementare S26.

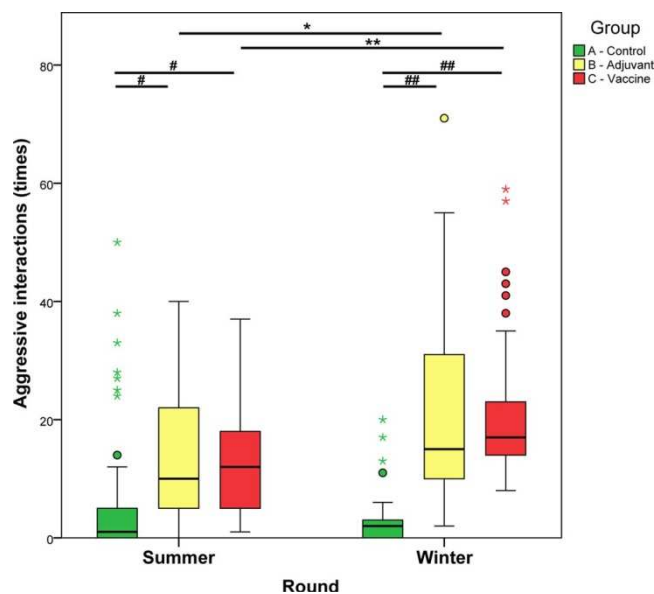


Fig. 5. Comportamento sociale: interazioni agonistiche (aggressive). Il Gruppo B (solo adjuvante, giallo) compie interazioni più aggressive in inverno (* $p_W = 0.018$). Il Gruppo C (Vaccino, rosso) compie interazioni più aggressive in inverno (** $p_W = 0.003$). I Gruppi B (solo Adjuvante, giallo) e C (Vaccino, rosso) compiono interazioni più aggressive, se confrontati con il Gruppo A (Controllo, verde) sia nella fase estiva (# $p_{KW} < 0.001$) che invernale. Confronti all'interno dei gruppi sono stati fatti attraverso il test Wilcoxon (W). Confronti tra i gruppi sono stati eseguiti dal test Kruskal-Wallis e il test post hoc Dunn. Le barre centrali indicano la mediana. Le estremità dei riquadri rappresentano il primo (Q1, inferiore) e il terzo (Q3, superiore) quartile. I riquadri rappresentano l'intervallo interquartile (IQ = $Q3 - Q1$), che rappresenta il 50% dei dati. I diagrammi a scatole e baffi sono stati calcolati dal IQ (superiore: $Q3 + 1.5 \times IQ$; inferiore: $Q1 - 1.5 \times IQ$) e rispecchiano la variabilità dei dati al di fuori di Q1 e Q3. I dati sono presentati nella tabella supplementare S27.

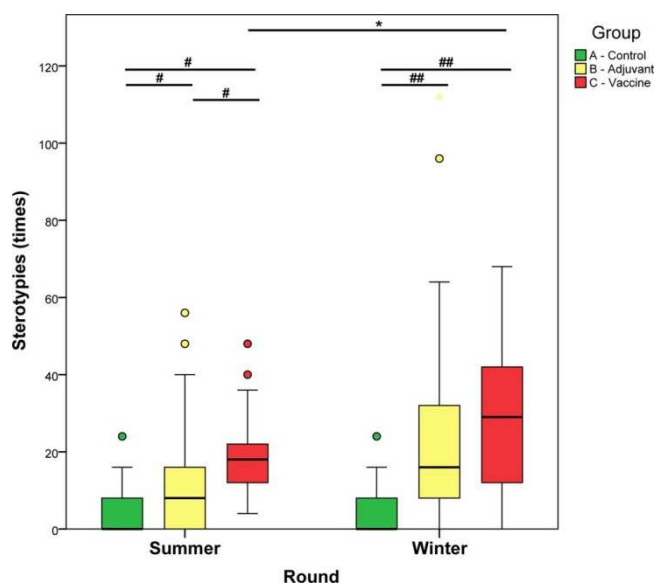


Fig. 6. Comportamento sociale: Stereotipi. Il Gruppo C (Vaccino, rosso) ha compiuto più stereotipi nella fase invernale (* $pW=0.002$). I Gruppi B (solo Adjuvante, giallo) e C (Vaccino, rosso) ha compiuto più stereotipi rispetto a quanto ha fatto il Gruppo A (Controllo, verde) in estate (# $pKW<0.001$) e in inverno (## $pKW<0.001$). Inoltre, il Gruppo C (Vaccino, rosso) ha compiuto più stereotipi rispetto al Gruppo B in estate (# $pKW<0.001$). Confronti all'interno dei gruppi sono stati fatti attraverso il test Wilcoxon (W).

Confronti tra i gruppi sono stati eseguiti dal test Kruskal-Wallis (KW) e il test post hoc Dunn. Le barre centrali indicano la mediana. Le estremità dei riquadri rappresentano il primo (Q1, inferiore) e il terzo (Q3, superiore) quartile. I riquadri rappresentano l'intervallo interquartile (IQ = $Q3-Q1$), che rappresenta il 50% dei dati. I diagrammi a scatole e baffi sono stati calcolati dal IQ (superiore: $Q3 + 1.5 \times IQ$; inferiore: $Q1 - 1.5 \times IQ$) e rispecchiano la variabilità dei dati al di fuori di Q1 e Q3. I dati sono presentati nella tabella supplementare S28.

E' risaputo che l'Alluminio è un metallo neurotossico [42, 43] che può raggiungere il sistema nervoso centrale (CNS) in modelli animali attraverso la via parenterale dopo inoculazioni intramuscolari o sottocutanee [44, 45, 23], che può aver contribuito alla comparsa dei cambiamenti comportamentali [23].

I test cognitivi e comportamentali applicati nel nostro studio sono stati usati precedentemente per studi su pecore e sono stati ampiamente validati [24-35]. Per meglio capire lo sviluppo dei cambiamenti cognitivi e comportamentali, abbiamo condotto i test dell'esperimento in due fasi: uno in tarda estate e l'altro in pieno inverno. Come indicato in precedenza [21], i cambiamenti comportamentali spontanei osservati nei greggi malati sono sempre più evidenti alle temperature fredde (cioè, condizioni invernali nell'emisfero nord) un'osservazione di difficile spiegazione ad oggi. Inoltre, con quel protocollo, abbiamo potuto quantificare l'effetto cumulativo delle dosi vaccinali nello sviluppo dei cambiamenti comportamentali. I risultati del nostro esperimento hanno indicato che i cambiamenti comportamentali sono stati più evidenti di inverno; comunque, i cambiamenti avrebbero potuto essere una risposta all'abbassamento della temperatura dell'aria, un sottoprodotto della diversità tra le stagioni nel numero di inoculazioni applicate, o una combinazione di entrambi. Probabilmente, le basse temperature agiscono insieme all'impatto cumulativo di fattori di stress multipli come i vaccini e/o gli adiuvanti di Alluminio, che giocano un ruolo nella patogenesi della sindrome ASIA ovina.

I test cognitivi usati nel nostro studio (labirinto a T, OFT e NOT) non hanno scoperto differenze significative tra i gruppi in nessuna delle due fasi. All'interno delle pecore trattate con vaccino (Gruppo C) e le pecore trattate con solo adiuvante (Gruppo B), esistono poche differenze significative tra le due fasi dei test. Tra gli agnelli trattati con vaccino il cambiamento più significativo è stato una riduzione del tempo passato a cercare di scappare dal luogo dei test nell'OFT in inverno

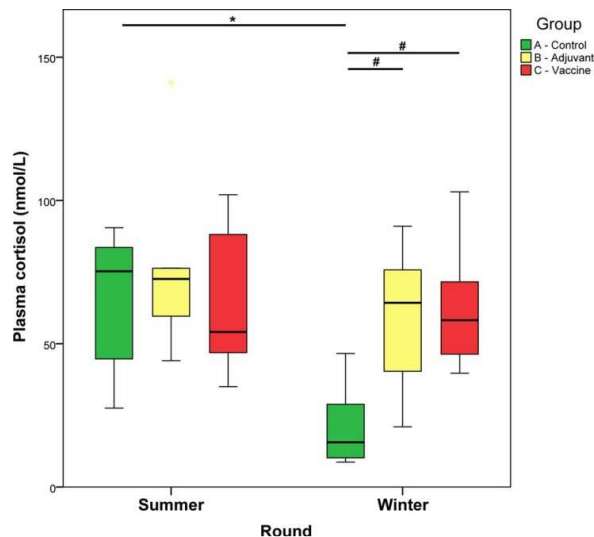


Fig. 7. Livelli di cortisolo nel plasma. Il Gruppo A (controllo, verde) mostra una diminuzione nei livelli di cortisolo (* $pt=0.002$) se si paragonano il periodo invernale ed estivo. I Gruppi B (Adjuvante, giallo) e C (Vaccino, rosso) mostrano livelli più alti di cortisolo rispetto al Gruppo A (controllo, verde) nel periodo invernale (# $pA=0.005$). I confronti all'interno dei gruppi sono stati eseguiti con il test ANOVA (A) e il test post hoc Duncan. Le barre centrali indicano la mediana. Le estremità dei riquadri rappresentano il primo (Q1, inferiore) e il terzo (Q3, superiore) quartile. I riquadri rappresentano l'intervallo interquartile (IQ = $Q3-Q1$), che rappresenta il 50% dei dati. I diagrammi a scatole e baffi sono stati calcolati dal IQ (superiore: $Q3 + 1.5 \times IQ$; inferiore: $Q1 - 1.5 \times IQ$) e rispecchiano la variabilità dei dati al di fuori di Q1 e Q3. I dati sono presentati in tavole supplementare S30 e S31.

che può riflettere una riduzione delle tendenze sociali degli agnelli vaccinati perché, in questo test, l'animale cerca di sfuggire all'isolamento del luogo per ritornare nel gruppo [46]. Inoltre, gli animali vaccinati hanno lasciato il primo luogo dei test del labirinto a T (latenza) più in fretta durante il secondo giorno rispetto al primo giorno della fase invernale, anche se il tempo impiegato a risolvere il labirinto non è cambiato. La differenza significativa nella latenza tra un giorno e l'altro può essere dovuta alla latenza eccezionalmente lunga degli animali del Gruppo vaccinato nel primo giorno del test. D'inverno, le pecore del Gruppo trattato con solo adiuvanti ha passato più tempo ad esplorare (OFT) di quanto abbiano fatto in estate e si sono mantenuti a distanza dall'oggetto nuovo alla seconda esposizione (NOT). Quei cambiamenti possono riflettere un livellodi agitazione o di paura [47, 33]. Nel complesso, i test cognitivi presentati alle pecore hanno indicato alcuni cambiamenti nei gruppi trattati con vaccino o con solo adiuvante, comunque, in generale, la vaccinazione o l'inoculazione con solo adiuvante è sembrato non avere un effetto marcato sui parametri cognitivi valutati dai diversi test applicati in questo studio.

Le osservazioni nel recinto casa dei comportamenti individuali hanno identificato parecchi cambiamenti comportamentali significativi, che erano più evidenti d'inverno. Le pecore dei gruppi trattati con vaccino e con solo adiuvante hanno passato più tempo in piedi o camminando e le pecore del Gruppo trattato con solo adiuvante hanno passato meno tempo sdraiate rispetto alle pecore del Gruppo di Controllo nella fase invernale. Le differenze tra i gruppi riguardo al tempo passato in piedi erano già evidenti nella fase estiva che implicava solo sette inoculazioni. I cambiamenti nei gruppi di trattamento riflettono il comportamento irrequieto o di eccitazione [48] perché gli schemi del riposo possono essere usati per identificare stress sociale nell'allevamento degli animali [49]. Le pecore mostrano uno schema di attività e riposo omogeneo e sincrono [49, 50], che appare alterato dalle inoculazioni. Quei cambiamenti sono stati simili ad alcuni dei sintomi segnalati dopo l'inoculazione dei vaccini contro la BT nel 2008-2010 [21]. Nel nostro studio, in inverno, i gruppi trattati con vaccino o solo adiuvante si sono nutriti di concentrato meno volte rispetto al Gruppo di Controllo.

Dato che la quantità di concentrato offerto a tutti i gruppi sia d'estate che d'inverno è stato lo stesso, e veniva consumato subito, probabilmente la frequenza ridotta riflette periodi prolungati di alimentazione alla tramoggia che è sintomatico di polifagia o alimentazione compulsiva. La polifagia è stato un sintomo negli animali che hanno mostrato la fase cronica della sindrome ASIA ovina dopo aver ricevuto le vaccinazioni contro la BT [21]. Non c'è sicurezza sul perché le pecore vaccinate del nostro studio in estate mangiassero paglia [fieno] meno frequentemente delle pecore di Controllo d'estate ma non d'inverno. Probabilmente quella differenza non era associata alle procedure vaccinali.

Nel nostro studio, le osservazioni nel recinto casa dei comportamenti sociali hanno dimostrato parecchi cambiamenti significativi nel comportamento dei gruppi trattati con vaccino o con solo adiuvante. In inverno le interazioni affiliative tra i gruppi trattati con solo adiuvanti e vaccini sono state molto meno frequenti che in estate. In inverno, ma non in estate, i gruppi trattati con solo adiuvante o con vaccino hanno mostrato significativamente meno interazioni affiliative del Gruppo di Controllo. D'inverno, gli animali vaccinati hanno significativamente avuto pochissime interazioni affiliative, persino meno del Gruppo degli agnelli trattati con solo adiuvante. In generale, le pecore sono socievoli e hanno un forte impulso a stare insieme ai compagni di gregge [51]. La Rasa Aragonesa è una razza autoctona particolarmente socievole e una riduzione delle interazioni affiliative di un individuo è raro e subito percepito da un osservatore. Una riduzione delle interazioni affiliative può indicare un effetto deleterio sul benessere dell'animale [52]. Nel nostro studio, d'estate e d'inverno, le frequenze delle interazioni aggressive e delle stereotipie sono state significativamente più alte nei gruppi trattati con vaccino o solo adiuvante rispetto al Gruppo di Controllo. Inoltre nei gruppi trattati la frequenza di quei comportamenti è stata significativamente più alta d'inverno che d'estate. La perdita di lana e la depilazione, che sono state causate dai morsi alla lana, sono avvenute solo nel Gruppo Vaccinato, d'inverno. Apparentemente questi tipi di cambiamenti comportamentali nelle pecore sono avvenuti ad uno stadio molto precoce del protocollo di inoculazione perché erano già significativamente più alti nei gruppi trattati rispetto al gruppo di controllo nella fase estiva, dopo solo sette inoculazioni somministrate. I comportamenti aggressivi sono spesso associati a interazioni gerarchiche e alla dominanza di alcuni individui sugli altri e le stereotipie sono comportamenti ripetitivi associati al peggioramento della condizione ambientale [53]. Aumenti di questi comportamenti sono stati correlati a uno stato di scarso benessere [36], che può anche essersi riflesso nella riduzione di interazioni affiliative. Le aggressioni (compreso i morsi alla lana) e le stereotipie nelle pecore possono essere associate all'alloggiamento, isolamento [27], e altri fattori di gestione compreso la dieta [25, 54, 26]. Nel nostro studio, tutti i gruppi sperimentali sono stati trattati allo stesso modo, che ha incluso il confinamento a lungo termine in uno spazio limitato. Nel Gruppo di Controllo, comunque, la frequenza di interazioni aggressive e stereotipie sono sempre state molto basse e non diversificate tra estate e inverno che noi abbiamo interpretato come i normali livelli di base. Questi risultati nel Gruppo di Controllo escludono altre cause conosciute di questi cambiamenti comportamentali e li legano ai trattamenti applicati agli altri gruppi. A nostro modo di vedere, tutti questi cambiamenti comportamentali mostrati dalle pecore trattate con vaccini o con solo adiuvante nel nostro studio sono della massima importanza poiché sono la prima spiegazione scientifica di alcuni dei cambiamenti comportamentali osservati precedentemente nei greggi colpiti dalla fase cronica della sindrome ASIA ovina [21]. Effettivamente, questi cambiamenti possono senza dubbio essere osservati dai veterinari e dagli allevatori nelle condizioni sul campo ma non sono mai stati scientificamente collegati alle vaccinazioni e/o alle inoculazioni di alluminio. La riduzione dei livelli di cortisolo nel Gruppo di Controllo nel nostro studio ha riflesso una variazione stagionale già descritta in precedenza nelle pecore tra Settembre e Febbraio [55]. Le pecore trattate con vaccino o solo adiuvante non hanno mostrate tale riduzione, differenziandosi quindi significativamente dal controllo in inverno. Il cortisolo è un buon indicatore di stress negli animali esposti a situazioni avverse [56,57], e riflette la stimolazione dell'asse ghiandolare ipotalamico-pituitario-surrenale [58]. Il nostro studio suggerisce che i livelli di stress sono stati più elevati negli animali trattati con i vaccini o solo adiuvanti di quanto non lo siano stati nel Gruppo di Controllo in inverno. La crescita dei globuli bianchi (WBC) e degli eosinofili negli animali vaccinati può indicare una crescita dello stress. Negli umani, lo stress, sia fisico che emozionale, è una delle principali cause di alti livelli di WBC, che è stato dimostrato nei topi [59]. Nei ruminanti, alti livelli di WBC sono stati associati alla movimentazione, che può essere stressante, la qual cosa suggerisce che la vaccinazione è stata responsabile di questa crescita di WBC nel Gruppo vaccinato. I vaccini che contengono alluminio inducono un effetto pro infiammatorio attraverso l'attivazione dell'inflammasoma [61] che tra gli altri effetti può condurre alla leucocitosi [62].

Pertanto, solo l'inoculazione ripetuta di vaccini o dell'adiuvante alluminio ha potuto indurre uno stato proinfiammatorio persistente nei nostri animali che hanno contribuito all'osservazione dei cambiamenti comportamentali. Sebbene la patogenesi di questo effetto sia ancora da chiarire, le reazioni autoimmunitarie generate lungo il corso di una infiammazione cronica, attiva può giocare un ruolo importante [11, 22].

La patologia realizzata alla fine del periodo sperimentale ha mostrato che gli animali trattati con i vaccini o solo adiuvante hanno presentato dei granulomi persistenti sottocutanei nel sito di inoculazione con migrazione attiva di macrofagi carichi di alluminio verso i linfonodi locali. Questi granulomi probabilmente agiscono da stimolo infiammatorio continuo e non-specifico e potrebbero aver contribuito in qualche modo ai cambiamenti comportamentali osservati nell'attuale lavoro. Una presentazione generale dei granulomi sarà descritta altrove [63].

5. Conclusioni

Questo è il primo studio scientifico che ha dimostrato i cambiamenti comportamentali delle pecore dopo ripetute inoculazioni di vaccini commerciali che contengono idrossido di alluminio o la quantità equivalente di semplice alluminio. Oltre a ciò, fornisce la prima spiegazione scientifica di alcuni cambiamenti segnalati in casi spontanei di sindrome ASIA ovina [21].

Conflitto di interesse

Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse.

Riconoscimenti

Ringraziamo con gratitudine Liliana Spuria, Ivàn Montañes e colleghi al Servizio Clínico de Ruminantes (SCRUM) dell'Università di Saragozza per il loro aiuto nella gestione e campionamento degli animali. Ringraziamo per l'uso del Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI, Università di Saragozza. I dati sulla temperatura media giornaliera sono stati gentilmente forniti dall'Agenzia Spagnola di Meteorologia (AEMET). J. ASIN è un dottorando finanziato dal Ministerio de Educación, Ciencia y Deporte (MECD). R. Reina è sostenuto da un contratto "Ramón y Cajal" del Ministero Spagnolo dell'Economia e Industria e Competitività (AGL2013-49137-C3-1-R e AGL2013-49137-C3-2-R).

Appendice A. Dati supplementari

Il materiale supplementare relativo a questo articolo si può trovare nella versione online al doi: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.10.019>.

Riferimenti

- [1] B. Greenwood, The contribution of vaccination to global health: past, present and future, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 369 (2014) 20130433.
- [2] P.L. Roeder, Rinderpest: the end of cattle plague, *Prev. Vet. Med.* 102 (2011) 98–106.
- [3] J.T. van Oirschot, Vaccination in food animal populations, *Vaccine* 12 (1994) 415–418.
- [4] S. Apostolico Jde, V.A. Lunardelli, F.C. Coirada, S.B. Boscardin, D.S. Rosa, Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing, *J. Immunol. Res.* 2016 (2016) 1459394.
- [5] E.B. Lindblad, Aluminium compounds for use in vaccines, *Immunol. Cell Biol.* 82

- (2004) 497–505.
- [6] G. Francois, P. Duclos, H. Margolis, D. Lavanchy, C.A. Siegrist, A. Meheus, et al., Vaccine safety controversies and the future of vaccination programs, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24 (2005) 953–961.
- [7] M.A. Maglione, L. Das, L. Raean, A. Smith, R. Chari, S. Newberry, et al., Safety of vaccines used for routine immunization of US children: a systematic review, Report/Technology Assessment No. 215. (Prepared by the Southern California Evidence-based Practice Center Under Contract No. 290-2007-10062-L.) AHRQ Publication No. 14-E002-EF, Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville, MD, 2014.
- [8] N.W. Baylor, W. Egan, P. Richman, Aluminum salts in vaccines—US perspective, *Vaccine* 3 (20 Suppl) (2002) S18–23.
- [9] T. Jefferson, M. Rudin, C. Di Pietrantonj, Adverse events after immunisation with aluminium-containing DTP vaccines: systematic review of the evidence, *Lancet Infect. Dis.* 4 (2004) 84–90.
- [10] R.K. Gherardi, F.J. Authier, Aluminum inclusion macrophagic myofasciitis: a recently identified condition, *Allergy Clin. North Am.* 23 (2003) 699–712.
- [11] T.D. Terhune, R.C. Deth, How aluminum adjuvants could promote and enhance non-target IgE synthesis in a genetically-vulnerable sub-population, *J. Immunotoxicol.* 10 (2013) 210–222.
- [12] M. Lombard, P.P. Pastoret, A.M. Moulin, A brief history of vaccines and vaccination, *Revue scientifique et technique* 26 (2007) 29–48.
- [13] S. Zientara, N.J. MacLachlan, P. Calistri, J.M. Sanchez-Vizcaino, G. Savini, Bluetongue vaccination in Europe, *Expert Rev. Vaccines* 9 (2010) 989–991.
- [14] N.J. MacLachlan, Bluetongue: history, global epidemiology and pathogenesis, *Prev. Vet. Med.* 102 (2011) 107–111.
- [15] G. Schultz, P.D. Delay, Losses in newborn lambs associated with bluetongue vaccination of pregnancy ewes, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 127 (1955) 224–226.
- [16] P. Roy, M. Boyce, R. Noad, Prospects for improved bluetongue vaccines, *Nat. Rev. Micro.* 7 (2009) 120–128.
- [17] G. Savini, N.J. MacLachlan, J.M. Sanchez-Vizcaino, S. Zientara, Vaccines against bluetongue in Europe, *Comp. Immunol. Microbiol. Infectious Dis.* 31 (2008) 101–120.
- [18] R. Wackerlin, M. Eschbaumer, P. Konig, B. Hoffmann, M. Beer, Evaluation of humoral response and protective efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 one year after vaccination of sheep and cattle, *Vaccine* 28 (2010) 4348–4355.
- [19] A.C. de Diego, P.J. Sanchez-Cordon, J.M. Sanchez-Vizcaino, Bluetongue in Spain: from the first outbreak to 2012, *Transbound. Emerg. Dis.* 61 (2014) e1–e11.
- [20] J.M. González, L. Figueras, M.E. Ortega, M. Lozano, M.R. de Arcaute, R. Royo, et al., Possible adverse reactions in sheep after vaccination with inactivated BTV vaccines, *Vet. Rec.* 166 (2010) 757–758.
- [21] L. Luján, M. Pérez, E. Salazar, N. Álvarez, M. Gimeno, P. Pinczowski, et al., Autoimmune/autoinflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA syndrome) in commercial sheep, *Immunol. Res.* 56 (2013) 317–324.
- [22] Y. Shoenfeld, N. Agmon-Levin, 'ASIA' - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants, *J. Autoimmun.* 36 (2011) 4–8.
- [23] G. Crepeaux, H. Eidi, M.O. David, Y. Baba-Amer, E. Tzavara, B. Giros, et al., Non-linear dose-response of aluminium hydroxide adjuvant particles: Selective low dose neurotoxicity, *Toxicology* 375 (2017) 48–57.
- [24] M. Pascual-Alonso, Miranda-de la Lama GC, Aguayo-Ulloa L, Villarreal M, Alierta S, Maria GA. Influence of coat colour on Chamarica sheep phenotypes, behaviour, welfare and performances, *Anim. Genet. Resour.* 54 (2014) 179–184.
- [25] J. Cooper, R. Jackson, A comparison of the feeding behaviour of sheep in straw yards and on slats, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 49 (1996) 99.
- [26] I.Y. Yurtman, T. Savas, F. Karaagac, L. Coskuntuna, Effects of daily protein intake levels on the oral stereotypic behaviours in energy restricted lambs, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 77 (2002) 77–88.
- [27] M. Lauber, J.A. Nash, A. Gatt, P.H. Hemsworth, Prevalence and Incidence of Abnormal Behaviours in Individually Housed Sheep, *Animals* 2 (2012) 27–37.
- [28] J.A. Abecia, A. Casao, M. Pascual-Alonso, S. Lobon, L.A. Aguayo-Ulloa, A. Meikle, et al., The effect of periconceptional undernutrition of sheep on the cognitive/emotional response and oocyte quality of offspring at 30 days of age, *J. Dev. Orig. Health Dis.* 5 (2014) 79–87.
- [29] E. Hosoi, D.M. Swift, L.R. Rittenhouse, R.W. Richards, Comparative foraging strategies of sheep and goats in a T-maze apparatus, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 44 (1995) 37–45.
- [30] K.M. Kendrick, A.P. da Costa, A.E. Leigh, M.R. Hinton, J.W. Peirce, Sheep don't forget a face, *Nature* 414 (2001) 165–166.
- [31] J.W. Peirce, A.E. Leigh, K.M. Kendrick, Configurational coding, familiarity and the right hemisphere advantage for face recognition in sheep, *Neuropsychologia* 38 (2000) 475–483.
- [32] M. Caroprese, M. Albenzio, A. Marzano, L. Schena, G. Annicchiarico, A. Sevi, Relationship between cortisol response to stress and behavior, immune profile, and production performance of dairy ewes, *J. Dairy Sci.* 93 (2010) 2395–2403.
- [33] B. Forkman, A. Boissy, M.C. Meunier-Salaun, E. Canali, R.B. Jones, A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses, *Physiol. Behav.* 92 (2007) 340–374.
- [34] L. Desire, I. Veissier, G. Despres, A. Boissy, On the way to assess emotions in animals: do lambs (*Ovis aries*) evaluate an event through its suddenness, novelty, or unpredictability? *J. Comp. Psychol.* 118 (2004) 363–374.
- [35] A. Romeyer, M.-F. Bouissou, Assessment of fear reactions in domestic sheep, and influence of breed and rearing conditions, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 34 (1992) 93–119.
- [36] J.L. Barnett, P.H. Hemsworth, The validity of physiological and behavioural measures of animal welfare, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 25 (1990) 177–187.
- [37] M. Pascual-Alonso, Lama G.C. Miranda-de la, L. Aguayo-Ulloa, L. Ezquerro, M. Villarreal, R.H. Marin, et al., Effect of postweaning handling strategies on welfare and productive traits in lambs, *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 18 (2015) 42–56.
- [38] M. Caroprese, Sheep housing and welfare, *Small Rumin. Res.* 76 (2008) 21–25.
- [39] M. Mendl, Some problems with the concept of a cut-off point for determining when an animal's welfare is at risk, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 31 (1991) 139–146.
- [40] G. Chacón Pérez, Laita S. Garcia-Belenguer, J.C. Illera del Portal, J. Palacio Liesa, Validation of an enzyme immunoassay technique for the determination of salivary cortisol in cattle, *Spanish J. Agric. Res.* 1 (2004) 45–52.
- [41] D. Lacasta, L.M. Ferrer, J.J. Ramos, J.M. González, A. Ortín, G.C. Pthenakis, Vaccination schedules in small ruminant farms, *Vet. Microbiol.* 181 (2015) 34–46.
- [42] S. Caito, M. Aschner, Neurotoxicity of metals, *Handb. Clin. Neurol.* 131 (2015) 169–189.
- [43] X.B. Li, H. Zheng, Z.R. Zhang, M. Li, Z.Y. Huang, H.J. Schluessener, et al., Glia activation induced by peripheral administration of aluminum oxide nanoparticles in rat brains, *Nanomed. : Nanotechnol. Biol. Med.* 5 (2009) 473–479.
- [44] Z. Khan, C. Combadiere, F.J. Authier, V. Itier, F. Lux, C. Exley, et al., Slow CCL2-dependent translocation of biopersistent particles from muscle to brain, *BMC Med.* 11 (2013) 99.
- [45] G. Crepeaux, H. Eidi, M.O. David, E. Tzavara, B. Giros, C. Exley, et al., Highly delayed systemic translocation of aluminum-based adjuvant in CD1 mice following intramuscular injections, *J. Inorg. Biochem.* 152 (2015) 199–205.
- [46] E.O. Price, J. Thos, Behavioral responses to short-term social isolation in sheep and goats, *Appl. Anim. Ethol.* 6 (1980) 331–339.
- [47] F. Wemelsfelder, M. Farish, Qualitative categories for the interpretation of sheep welfare: a review, *Anim. Welf.* 13 (2004) 261–268.
- [48] D.M. Broom, A.F. Fraser, *Domestic Animal Behaviour and Welfare*, 5th ed., CABI Publishing, Oxford, 2016.
- [49] A.F. Fraser, Welfare terminology and concepts, in: A.F. Fraser, D.M. Broom (Eds.), *Farm Animal Behavior and Welfare*, CABI Publishing, Oxford, 1997, pp. 256–357.
- [50] A.J. Rook, P.D. Penning, Synchronisation of eating, ruminating and idling activity by grazing sheep, *Appl. Anim. Behav. Sci.* 32 (1991) 157–166.
- [51] A. Fischer, L. Matthews, The social behavior of sheep, in: L.F. Keelin (Ed.), *Social Behaviour in Farm Animals*, CABI Publishing, Oxford, 2001, pp. 211–239.
- [52] D.J. Mellor, Enhancing animal welfare by creating opportunities for positive affective engagement, *N. Z. Vet. J.* 63 (2015) 3–8.
- [53] Mason GJ. Stereotypies and suckling, *Behav. Processes* 25 (1991) 103–115.
- [54] S. Vasseur, D.R. Paull, S.J. Atkinson, I.G. Colditz, A.D. Fisher, Effects of dietary fibre and feeding frequency on wool biting and aggressive behaviours in housed Merino sheep, *Aust. J. Exp. Agric.* 46 (2006) 777–782.
- [55] T. Snoj, Z. Jenko, N. Cebulj-Kadunc, Fluctuations of serum cortisol, insulin and non-esterified fatty acid concentrations in growing ewes over the year, *Ir. Vet. J.* 67 (2014) 22.
- [56] D.M. Broom, J.A. Goode, S.J.G. Hall, D.M. Lloyd, R.F. Parrott, Hormonal and physiological effects of a 15 hour road journey in sheep: comparison with the responses to loading, handling and penning in the absence of transport, *Br. Vet. J.* 152 (1996) 593–604.
- [57] A.D. Fisher, M.A. Crowe, E.M. O'Nuallain, M.L. Monaghan, D.J. Prendiville, P. O'Kiely, et al., Effects of suppressing cortisol following castration of bull calves on adrenocorticotrophic hormone, in vitro interferon-gamma production, leukocytes, acute-phase proteins, growth, and feed intake, *J. Anim. Sci.* 75 (1997) 1899–1908.
- [58] S.D. Hewagalamulage, I.J. Clarke, A. Rao, B.A. Henry, Ewes With Divergent Cortisol Responses to ACTH Exhibit Functional Differences in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis, *Endocrinology* 157 (2016) 3540–3549.
- [59] T. Heidt, H.B. Sager, G. Courties, P. Dutta, Y. Iwamoto, A. Zaltsman, et al., Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells, *Nat. Med.* 20 (2014) 754–758.
- [60] A. Ramos, P. Mormede, Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22 (1998) 33–57.
- [61] S.C. Eisenbarth, O.R. Colegio, W. O'Connor, F.S. Sutterwala, R.A. Flavell, Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants, *Nature* 453 (2008) 1122–1126.
- [62] R.W. Grant, V.D. Dixit, Mechanisms of disease: inflammasome activation and the development of type 2 diabetes, *Front. Immunol.* 4 (2013) 50.
- [63] Asin J, Molin J, Pérez M, Pinczowski P, Gimeno M, Navascués N, Muniesa A, de Blas L, Lacasta D, Fernández A, de Pablo L, Mold M, Exley C, de Andrés D, Reina R, Luján L. Granulomas following subcutaneous injection with aluminum adjuvant-containing products in sheep. *Veterinary Pathology*, accepted. <https://doi.org/10.1177/0300985818809142>. [Epub ahead of print].

Materiale supplementare

Funzione cognitiva e comportamento nelle pecore a cui siano stati inoculati ripetutamente vaccini contenenti adiuvanti di alluminio o soltanto adiuvante di alluminio

Javier Asín, María Pascual-Alonso, Pedro Pinczowski, Marina Gimeno, Marta Pérez, Ana Muniesa, Lorena de Pablo, Ignacio de Blas, Delia Lacasta, Antonio Fernández, Damián de Andrés, Gustavo María, Ramsés Reina, Lluís Luján

Tabella supplementare S1. Calendario degli eventi di ciascun test nei due round dell'esperimento.

dpi: giorni dopo la prima inoculazione; Td1: T-maze day 1; Td2: T-maze day 2; OFT: Open Field Test; NOT: Novel Object Test.

	Round Estivo (Settembre 2015)										Round invernale (Gennaio/Febbraio 2016)												
Giorno	8	9	10	14	15	16	17	18	19	20	21	26	27	28	1	2	3	4	5	6	7	8	
dpi	196	197	198				202-208				209	336	337	338				342-348					349
Test	Td1	Td2	OFT NOT		Registrazioni / osservazioni di comportamento							Analisi del sangue	Td1	Td2	OFT NOT		Registrazioni / osservazioni di comportamento						Analisi del sangue

Tabella supplementare S2. Studio del comportamento individuale

Comportamento	Descrizione
Alimentazione su concentrato (FC)	Agnello alla ricerca di cibo nella tramoggia di concentrato e che lo mangia
Mangiare paglia (ES)	Agnello alla ricerca di paglia nella tramoggia del foraggio e che la mangia
A riposo (RT)	Agnello sdraiato
In piedi (ST)	Agnello in piedi su tutte e quattro le gambe o cammina
Bere (DK)	Agnello che beve acqua dall'abbeveratoio

Tabella supplementare S3. Studio dei comportamenti sociali. Le interazioni affiliate hanno una connotazione positiva e implicano, in ogni caso, una doppia componente di interazione tra due agnelli. Le interazioni agonistiche (aggressive) hanno una connotazione negativa e una componente di intenzionalità da un animale all'altro. Gli stereotipi hanno anche una connotazione negativa.

Interazioni Affiliate

A seguire	Un agnello segue un altro agnello con l'intenzione di tenerlo vicino
Leccata	Un agnello lecca il corpo di un altro agnello
Annusamento	Un agnello annusa il corpo di un altro agnello
Montaggio sessuale	Un agnello monta un altro agnello in gioco o con intenti sessuali
Sfregamento	Un agnello viene strofinato dal corpo di un altro agnello
Preparando	Un agnello prepara un altro agnello
Riposo insieme	Due o più agnelli si sdraiano insieme a un componente di interazione

Interazioni Agonistiche (Aggressive)

testa cozzare	Un agnello usa la parte anteriore della testa per entrare in contatto con un altro agnello
Sbattere il corpo	Un agnello spinge un altro agnello con il suo corpo
lana mordere	Un agnello morde un'altra lana d'agnello
scalpitare	Un agnello usa la zampa anteriore per dare un calcio ad un altro agnello
Montaggio minaccioso	Un agnello monta un altro agnello con l'intenzione di spostarlo
Chasing	Un agnello minaccia un altro agnello con un colpo alla testa senza contatto
	Un agnello si muove attivamente verso un altro agnello, inducendolo a camminare o scappare

Stereotipi

Numero di volte in cui un agnello ripete un comportamento anomalo, vale a dire: graffio compulsivo contro il muro, leccatura ripetitiva delle barre della tramoggia, ecc.

Tabella supplementare S4. Funzione cognitiva. T-maze test. Tempo trascorso a lasciare la prima area (latenza) nel round estivo. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) per la latenza nel round estivo. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il tempo medio (s) che gli agnelli di ogni gruppo impiegano per lasciare la prima area del T-maze \pm errore standard e i numeri nella riga in basso indicano la mediana con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: solo adiuvanti; Gruppo C: Vaccino; Giorno 1: primo giorno del test; Giorno 2: Secondo giorno del test; W: test di Wilcoxon; t: T test degli studenti; A: ANOVA; KW: Kruskal-Wallis.

	Giorno 1	Giorno 2	p
Gruppo A	2.29 \pm 0.42 2 (1.5-3)	5.29 \pm 1.69 4 (2.5-6.5)	0.089 ^t
Gruppo B	4.86 \pm 1.67 2 (1.5-8)	9.71 \pm 3.88 8 (4.5-9)	0.116 ^W
Gruppo C	4.29 \pm 1.54 2 (1-7)	54.57 \pm 48.41 7 (5-9)	0.306 ^W
p	0.378 ^A	0.416 ^{KW}	

Tabella supplementare S5. Funzione cognitiva. T-maze test. Tempo trascorso a lasciare la prima area (latenza) nel round invernale. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) per la latenza nel round estivo. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il tempo medio (s) che gli agnelli di ogni gruppo impiegano per lasciare la prima area del T-maze \pm errore standard e i numeri nella riga in basso indicano la mediana con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: solo adiuvanti; Gruppo C: Vaccino; Giorno 1: primo giorno del test; Giorno 2: Secondo giorno del test; W: test di Wilcoxon; t: T test degli studenti; A: ANOVA; KW: Kruskal-Wallis.

	Giorno 1	Giorno 2	p
Gruppo A	2.57 \pm 0.65 2 (1.5-3)	2.57 \pm 0.48 2 (2-3)	>0.999 ^t
Gruppo B	5.14 \pm 2.05 3 (2-5)	4.29 \pm 1.39 2 (2-6.5)	0.680 ^w
Gruppo C	11.14 \pm 6.87 5 (2.5-7)	1.71 \pm 0.42 1 (1-2)	0.027 ^{w*}
p	0.218 ^{KW}	0.152 ^{KW}	

Tabella supplementare S6. Funzione cognitiva. T-maze test. Tempo trascorso a raggiungere la zona target nel round estivo. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) per la latenza nel round estivo. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il tempo medio (s) che gli agnelli di ogni gruppo impiegano a raggiungere la zona target del labirinto \pm errore standard e i numeri nella riga in basso indicano la mediana con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: solo adiuvanti; Gruppo C: Vaccino; Giorno 1: primo giorno del test; Giorno 2: Secondo giorno del test; W: test di Wilcoxon; t: T test degli studenti; A: ANOVA; KW: Kruskal-Wallis.

	Giorno 1	Giorno 2	p
Gruppo A	33.86 \pm 19.77 17 (13.5-18)	74.86 \pm 47.20 13 (9.5-72)	0.735 ^W
Gruppo B	70.71 \pm 24.34 47 (29.5-89)	19.57 \pm 6.48 11 (7.5-29)	0.083 ^t
Gruppo C	107.00 \pm 47.20 73 (14-146)	80.14 \pm 46.24 25 (13-77.5)	0.398 ^W
p	0.209 ^{KW}	0.329 ^{KW}	

Tabella supplementare S7. Funzione cognitiva. T-maze test. Tempo trascorso a raggiungere la zona target nel round invernale. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) per la latenza nel round estivo. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il tempo medio (s) che gli agnelli di ogni gruppo impiegano a raggiungere la zona target del labirinto \pm errore standard e i numeri nella riga in basso indicano la mediana con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: solo adiuvanti; Gruppo C: Vaccino; Giorno 1: primo giorno del test; Giorno 2: Secondo giorno del test; W: test di Wilcoxon; t: T test degli studenti; A: ANOVA; KW: Kruskal-Wallis.

	Giorno 1	Giorno 2	p
Gruppo A	26.71 \pm 9.64 18 (6-40.5)	18.43 \pm 6.66 12 (6.5-24)	0.512 ^t
Gruppo B	43.00 \pm 22.90 12 (10-44.5)	13.14 \pm 3.01 15 (6-18)	0.310 ^w
Gruppo C	26.43 \pm 8.46 30 (7-34.5)	10.57 \pm 2.68 7 (5-15.5)	0.061 ^t
p	0.865 ^{KW}	0.467 ^A	

Tabella supplementare S8. Funzione cognitiva. T-maze test. Tempo trascorso a risolvere il labirinto nel round estivo. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) per la latenza nel round estivo. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il tempo medio (s) che gli agnelli di ogni gruppo impiegano per mettersi di fronte allo specchio e alla cassa \pm errore standard e i numeri nella riga in basso indicano la mediana con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: solo adiuvanti; Gruppo C: Vaccino; Giorno 1: primo giorno del test; Giorno 2: Secondo giorno del test; W: test di Wilcoxon; t: T test degli studenti; A: ANOVA; KW: Kruskal-Wallis.

	Giorno 1	Giorno 2	p
Gruppo A	39.71 \pm 19.29 20 (18-31)	76.71 \pm 46.96 15 (11.5-74.5)	0.866 ^W
Gruppo B	73.71 \pm 24.77 51 (31.5-91)	21.29 \pm 6.46 13 (9-30.5)	0.081 ^t
Gruppo C	111.00 \pm 46.32 75 (21.5-149.5)	81.71 \pm 45.94 27 (15.5-78.5)	0.398 ^W
p	0.200 ^{KW}	0.329 ^{KW}	

Tabella supplementare S9. Funzione cognitiva. T-maze test. Tempo trascorso a risolvere il labirinto nel round invernale. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) per la latenza nel round estivo. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il tempo medio (s) che gli agnelli di ogni gruppo impiegano per mettersi di fronte allo specchio e alla cassa \pm errore standard e i numeri nella riga in basso indicano la mediana con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: solo adiuvanti; Gruppo C: Vaccino; Giorno 1: primo giorno del test; Giorno 2: Secondo giorno del test; W: test di Wilcoxon; t: T test degli studenti; A: ANOVA; KW: Kruskal-Wallis.

	Giorno 1	Giorno 2	p
Gruppo A	34.29 \pm 9.56 36 (13.5-49)	20.29 \pm 6.63 14 (8-26.5)	0.308 ^t
Gruppo B	48.00 \pm 22.33 29 (14-47.5)	15.00 \pm 3.20 17 (7.5-20.5)	0.063 ^w
Gruppo C	38.57 \pm 9.86 36 (21.5-54)	16.57 \pm 2.26 18 (14-20)	0.064 ^t
p	0.904 ^{KW}	0.694 ^A	

Tabella supplementare S10. Funzione cognitiva. T-maze test. Numero di aree attraversate nel round estivo. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) per il numero di aree attraversate nel round estivo. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il numero medio di aree del labirinto attraversate dagli agnelli di ogni gruppo \pm errore standard e i numeri nella riga in basso indicano la mediana con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: solo adiuvanti; Gruppo C: Vaccino; Giorno 1: primo giorno del test; Giorno 2: Secondo giorno del test; W: test di Wilcoxon; t: T test degli studenti; A: ANOVA; KW: Kruskal-Wallis.

	Giorno 1	Giorno 2	p
Gruppo A	8.57 \pm 1.73 6 (6-11)	14.14 \pm 7.07 6 (4-13)	0.674 ^W
Gruppo B	7.71 \pm 1.41 6 (6-7)	6.57 \pm 2.26 4 (4-5)	0.219 ^W
Gruppo C	9.29 \pm 1.94 8 (7-9.5)	10.14 \pm 5.10 4 (4-9)	0.498 ^W
p	0.603 ^{KW}	0.594 ^{KW}	

Tabella supplementare S11. Funzione cognitiva. T-maze test. Tempo trascorso a lasciare la prima area (latenza) nel round invernale. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) per il numero di aree attraversate nel round invernale. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il numero medio di aree del labirinto attraversate dagli agnelli di ogni gruppo \pm errore standard e i numeri nella riga in basso indicano la mediana con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: solo adiuvanti; Gruppo C: Vaccino; Giorno 1: primo giorno del test; Giorno 2: Secondo giorno del test; W: test di Wilcoxon; t: T test degli studenti; A: ANOVA; KW: Kruskal-Wallis.

	Giorno 1	Giorno 2	p
Gruppo A	13.71 \pm 3.04 12 (8-20)	9.00 \pm 2.63 6 (4-11)	0.496 ^W
Gruppo B	13.71 \pm 5.83 6 (4-16)	6.86 \pm 1.74 4 (4-8)	0.500 ^W
Gruppo C	14.00 \pm 5.86 10 (5-13)	8.57 \pm 0.84 10 (8-10)	0.588 ^W
p	0.771 ^{KW}	0.490 ^{KW}	

Tabella supplementare S12. Funzione cognitiva. Open Field Test (OFT). Camminata. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) della quantità di tempo che gli agnelli trascorrono camminando in ciascuno dei due round dell'OFT. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il tempo medio (s) che gli agnelli trascorrono camminando \pm errore standard e i numeri nella riga in basso indicano la mediana con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: solo adiuvanti; Gruppo C: Vaccino; Giorno 1: primo giorno del test; Giorno 2: Secondo giorno del test; W: test di Wilcoxon; t: T test degli studenti; A: ANOVA; KW: Kruskal-Wallis.

	Estate	Inverno	p
Gruppo A	117.29 \pm 18.37 113 (91-135)	170.29 \pm 16.13 168 (139-208.5)	0.074 ^t
Gruppo B	117.71 \pm 15.34 114 (94.5-143)	170.43 \pm 19.90 167 (138.5-207)	0.068 ^t
Gruppo C	127.57 \pm 14.93 121 (117-139)	153.86 \pm 17.22 168 (125-179.5)	0.330 ^t
p	0.881 ^A	0.755 ^A	

Tabella supplementare S13. Funzione cognitiva. Open Field Test (OFT). Esplorazione. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) della quantità di tempo che gli agnelli trascorrono esplorando in ciascuno dei due round dell'OFT. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il tempo medio (s) che gli agnelli trascorrono esplorando \pm errore standard e i numeri nella riga in basso indicano la mediana con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: solo adiuvanti; Gruppo C: Vaccino; Giorno 1: primo giorno del test; Giorno 2: Secondo giorno del test; W: test di Wilcoxon; t: T test degli studenti; A: ANOVA; KW: Kruskal-Wallis.

	Estate	Inverno	p
Gruppo A	46.43 \pm 10.73 41 (27-52)	45.14 \pm 6.06 49 (39-54.5)	0.896 ^t
Gruppo B	35.57 \pm 8.23 34 (22-37)	54.71 \pm 8.27 54 (38.5-69)	0.043 ^{W*}
Gruppo C	37.29 \pm 7.09 40 (25.5-45.5)	46.86 \pm 12.92 44 (17-67.5)	0.543 ^t
p	0.527 ^{KW}	0.754 ^A	

Tabella supplementare S14. Funzione cognitiva. Test in campo aperto (OFT). Hanno provato a scappare. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) del tempo che gli agnelli hanno passato a provare a scappare in ognuno dei due round del test OFT. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il tempo medio che gli agnelli hanno passato nel cercare di scappare dall'arena del test \pm errore standard, mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; Estate: turno estivo; Inverno: turno invernale; t: test T dello studente; A: ANOVA.

	Estate	Inverno	p
Gruppo A	85.86 \pm 23.33 76 (57-113.5)	80.71 \pm 18.37 100 (52.5-112.5)	0.766 ^t
Gruppo B	100.00 \pm 32.82 94 (28.5-163)	69.43 \pm 24.60 72 (16-100)	0.201 ^t
Gruppo C	118.57 \pm 25.71 139 (86.5-160)	48.00 \pm 12.70 47 (27.5-72.5)	0.003 ^{t*}
p	0.707 ^A	0.486 ^A	

Tabella supplementare S15. Funzione cognitiva. Test in campo aperto (OFT). In piedi. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) del tempo che gli agnelli hanno trascorso in piedi durante i due round del test OFT. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il tempo medio che gli agnelli hanno passato in piedi \pm errore standard, mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; Estate: turno estivo; Inverno: turno invernale; t: test T dello studente; A: ANOVA.

	Estate	Inverno	p
Gruppo A	138.57 \pm 30.22 130 (89-201)	142.57 \pm 22.23 131 (127-163.5)	0.906 ^t
Gruppo B	176.86 \pm 38.58 161 (105-262)	144.14 \pm 30.48 99 (86-193)	0.132 ^t
Gruppo C	134.57 \pm 28.00 103 (86-165.5)	195.86 \pm 32.07 193 (163-215.5)	0.127 ^t
p	0.607 ^A	0.346 ^A	

Tabella supplementare S16. Funzione cognitiva. Test in campo aperto (OFT). Tentativi di fuga. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) del numero di tentativi di fuga (salti) operati dagli agnelli in ciascuno dei due round del test OFT. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il numero medio di tentativi di fuga (salti) operati dagli agnelli \pm errore standard , mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; Estate: turno estivo; Inverno: turno invernale; t: test T dello studente; A: ANOVA.

	Estate	Inverno	p
Gruppo A	15.86 \pm 4.86 12 (11.5-17)	22.57 \pm 4.52 25 (19-29.5)	0.256 ^t
Gruppo B	20.29 \pm 6.51 19 (7-31.5)	19.86 \pm 5.98 20 (9-29)	0.893 ^t
Gruppo C	22.00 \pm 4.74 26 (17-29)	17.14 \pm 5.46 11 (9-24.5)	0.357 ^t
p	0.716 ^A	0.776 ^A	

Tabella supplementare S17. Funzione cognitiva. Test in campo aperto (OFT). Belati. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) del numero di belati da parte degli animali nei due round del test OFT. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il numero medio di belati da parte degli animali \pm errore standard, mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; Estate: turno estivo; Inverno: turno invernale; W: test di Wilcoxon; t: test T dello studente; A: ANOVA; KW: Kruskal Wallis.

	Estate	Inverno	p
Gruppo A	39.00 \pm 13.36 36 (23-39.5)	45.29 \pm 8.48 43 (31-63)	0.619 ^t
Gruppo B	38.43 \pm 7.17 47 (31-50.5)	36.57 \pm 6.91 38 (28-46.5)	0.691 ^t
Gruppo C	40.57 \pm 10.03 41 (27.5-52)	33.57 \pm 8.94 19 (14-55)	0.398 ^W
p	0.989 ^A	0.585 ^{KW}	

Tabella supplementare S18. Funzione cognitiva. Test su oggetti nuovi (NOT) durante il turno estivo. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) della distanza tra l'agnello e l'oggetto nuovo durante il turno estivo. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano la distanza media (cm) tra l'agnello e l'oggetto nuovo 30 secondi dopo l'esposizione a tale oggetto sconosciuto \pm errore standard, mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; Dist. 1: Distanza dopo la prima esposizione; Dist. 2: Distanza dopo la seconda esposizione; W: test di Wilcoxon; t: test T dello studente; A: ANOVA; KW: Kruskal Wallis.

	Dist 1	Dist 2	p
Gruppo A	78.57 \pm 21.43 50 (50-75)	67.86 \pm 24.83 50 (37.5-75)	0.671 ^W
Gruppo B	92.86 \pm 17.00 100 (50-125)	82.14 \pm 22.96 50 (50-125)	0.629 ^t
Gruppo C	75.00 \pm 19.67 50 (50-112.5)	142.86 \pm 24.83 125 (100-200)	0.089 ^t
p	0.699 ^{KW}	0.094 ^A	

Tabella supplementare S19. Funzione cognitiva. Test su oggetti nuovi (NOT) durante il turno invernale. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) della distanza tra l'agnello e l'oggetto nuovo durante il turno invernale. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano la distanza media (cm) tra l'agnello e l'oggetto nuovo 30 secondi dopo l'esposizione a tale oggetto sconosciuto \pm errore standard, mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; Dist. 1: Distanza dopo la prima esposizione; Dist. 2: Distanza dopo la seconda esposizione; W: test di Wilcoxon; t: test T dello studente; A: ANOVA; KW: Kruskal Wallis.

	Dist 1	Dist 2	p
Gruppo A	75.00 \pm 23.78 50 (25-112.5)	114.29 \pm 17.13 125 (87.5-150)	0.235 ^W
Gruppo B	75.00 \pm 22.49 75 (37.5-100)	128.57 \pm 12.71 125 (100-150)	0.043 ^{W*}
Gruppo C	89.29 \pm 26.08 100 (37.5-137.5)	78.57 \pm 21.43 75 (37.5-125)	0.751 ^t
p	0.917 ^{KW}	0.259 ^{KW}	

Tabella supplementare S20. Comportamento individuale. Alimentazione a base di concentrato (FC). Confronti indipendenti (colonne) di FC nei due round del test. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il numero medio di volte in cui gli agnelli hanno mangiato il concentrato dalla tramoggia \pm errore standard, mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; Estate: turno estivo; Inverno: turno invernale; Apici (a, b) indicano differenze statistiche significative tra i gruppi basate su test *post hoc*. KW: test di Kruskal Wallis.

	Estate	Inverno
Gruppo A	3.33 \pm 0.28 3 (2-4)	3.45 \pm 0.21 3 ^a (3-4)
Gruppo B	3.08 \pm 0.31 3 (2-4)	2.63 \pm 0.14 2 ^b (2-3)
Gruppo C	2.94 \pm 0.23 2 (2-4)	2.24 \pm 0.14 2 ^b (2-3)
p	0.355 ^{KW}	<0.001 ^{KW*}

Tabella supplementare S21. Comportamento individuale. Mangiare paglia (ES). Confronti indipendenti (colonne) di ES nei due round del test. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il numero medio di volte in cui gli agnelli hanno mangiato paglia dalla tramoggia del foraggio \pm errore standard , mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; Estate: turno estivo; Inverno: turno invernale; Apici (a, b) indicano differenze statistiche significative tra i gruppi basate su test *post hoc*. KW: test di Kruskal Wallis.

	Estate	Inverno
Gruppo A	7.88 \pm 0.55 7 ^a (5-11)	14.71 \pm 0.49 15 (12-17)
Gruppo B	6.59 \pm 0.49 6 ^{a,b} (4-9)	14.90 \pm 0.37 15 (14-16)
Gruppo C	5.49 \pm 0.38 5 ^b (5-7)	14.43 \pm 0.34 14 (12-16)
p	0.018 ^{KW*}	0.472 ^{KW}

Tabella supplementare S22. Comportamento individuale. Riposare (RT). Confronti indipendenti (colonne) di RT nei due round del test. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il numero medio di volte in cui gli agnelli si sono sdraiati \pm errore standard, mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; Estate: turno estivo; Inverno: turno invernale; Apici (a, b) indicano differenze statistiche significative tra i gruppi basate su test *post hoc*. KW: test di Kruskal Wallis.

	Estate	Inverno
Gruppo A	20.20 \pm 0.56 21 (17-24)	9.94 \pm 0.48 9 ^a (7-12)
Gruppo B	18.73 \pm 0.60 18 (16-20)	8.00 \pm 0.57 7 ^b (5-10)
Gruppo C	19.37 \pm 0.66 19 (16-24)	8.73 \pm 0.35 9 ^{a,b} (7-10)
p	0.156 ^{KW}	0.027 ^{KW*}

Tabella supplementare S23. Comportamento individuale. Stare in piedi (ST). Confronti indipendenti (colonne) di ST nei due round del test. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il numero medio di volte in cui gli agnelli sono rimasti in piedi sulle quattro zampe o hanno camminato \pm errore standard, mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; Estate: turno estivo; Inverno: turno invernale; Apici (a, b) indicano differenze statistiche significative tra i gruppi basate su test *post hoc*. KW: test di Kruskal Wallis.

	Estate	Inverno
Gruppo A	6.33 ^a \pm 0.39 6 (4-8)	9.33 ^a \pm 0.50 10 (6-11)
Gruppo B	9.31 ^b \pm 0.48 9 (8-12)	12.43 ^b \pm 0.57 13 (10-15)
Gruppo C	10.00 ^b \pm 0.49 10 (7-12)	11.06 ^b \pm 0.47 11 (9-13)
p	<0.001 ^{A*}	<0.001 ^{A*}

Tabella supplementare S24. Comportamento individuale. Bere (DK). Confronti indipendenti (colonne) di DK nei due round del test. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il numero medio di volte in cui gli agnelli hanno bevuto acqua dall'abbeveratoio \pm errore standard, mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; Estate: turno estivo; Inverno: turno invernale; Apici (a, b) indicano differenze statistiche significative tra i gruppi basate su test *post hoc*. KW: test di Kruskal Wallis.

	Estate	Inverno
Gruppo A	0.41 \pm 0.10 0 (0-1)	0.14 \pm 0.05 0 (0-0)
Gruppo B	0.43 \pm 0.12 0 (0-1)	0.04 \pm 0.03 0 (0-0)
Gruppo C	0.27 \pm 0.08 0 (0-0)	0.12 \pm 0.06 0 (0-0)
p	0.576 ^{KW}	0.228 ^{KW}

Tabella supplementare S25. Modello Generale Lineare per i comportamenti individuali. I numeri indicano l'importanza statistica (p) dei fattori valutati in ogni comportamento e le loro interazioni appaiate. FC: Alimentazione a base di concentrato; ES: Mangiare paglia; RT: Riposare; ST: Stare in piedi; DK: Bere.

	FC	ES	RT	ST	DK
Gruppo	<0.001*	0.029*	0.007*	<0.001*	0.610
Round	0.016*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*
Gruppo x Round	0.051	0.094	0.889	0.035*	0.335

Tabella supplementare S26. Comportamento sociale. Interazioni affiliative. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) delle interazioni affiliative nei due round. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il numero medio di volte in cui gli agnelli hanno avuto un'interazione affiliativa \pm errore standard, mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; Estate: turno estivo; Inverno: turno invernale; Apici (a, b) indicano differenze statistiche significative tra i gruppi. W: Wilcoxon; KW: test di Kruskal Wallis.

	Estate	Inverno	p
Gruppo A	10.61 \pm 1.00 10 (5-15)	11.16 \pm 1.05 9 ^a (6-15)	0.674 ^W
Gruppo B	12.49 \pm 1.54 10 (5-16)	8.18 \pm 0.66 7 ^b (5-11)	0.045 ^{W*}
Gruppo C	11.82 \pm 1.10 11 (5-17)	1.49 \pm 0.33 1 ^c (0-2)	<0.001 ^{W*}
p	0.742 ^{KW}	<0.001 ^{KW*}	

Tabella supplementare S27. Comportamento sociale. Interazioni agonistiche (aggressive). Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) delle interazioni aggressive nei due round. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il numero medio di volte in cui gli agnelli hanno avuto un'interazione aggressiva \pm errore standard, mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; Estate: turno estivo; Inverno: turno invernale; Apici (a, b) indicano differenze statistiche significative tra i gruppi. W: Wilcoxon; KW: test di Kruskal Wallis.

	Estate	Inverno	p
Gruppo A	6.61 \pm 1.64 1 ^a (0-5)	2.67 \pm 0.60 2 ^a (0-3)	0.062 ^W
Gruppo B	13.06 \pm 1.43 10 ^b (5-22)	20.90 \pm 2.28 15 ^b (10-31)	0.018 ^{W*}
Gruppo C	13.08 \pm 1.31 12 ^b (5-18)	21.14 \pm 1.67 17 ^b (14-23)	0.003 ^{W*}
p	<0.001 ^{KW*}	<0.001 ^{KW*}	

Tabella supplementare S28. Comportamento sociale. Stereotipie. Confronti indipendenti (colonne) e accoppiati (righe) delle stereotipie nei due round. Per ogni gruppo, i numeri nella riga superiore indicano il numero medio di volte in cui gli agnelli hanno avuto una stereotipia \pm errore standard, mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; Estate: turno estivo; Inverno: turno invernale; Apici (a, b) indicano differenze statistiche significative tra i gruppi. W: Wilcoxon; KW: test di Kruskal Wallis.

	Estate	Inverno	p
Gruppo A	6.20 \pm 1.17 0 ^a (0-8)	4.41 \pm 0.99 0 ^a (0-8)	0.158 ^W
Gruppo B	13.27 \pm 2.18 8 ^b (0-16)	22.29 \pm 3.42 16 ^b (8-32)	0.055 ^W
Gruppo C	18.78 \pm 1.30 18 ^c (12-22)	29.02 \pm 2.71 29 ^b (12-42)	0.002 ^{W*}
p	<0.001 ^{KW*}	<0.001 ^{KW*}	

Tabella supplementare S29. Modello Generale Lineare per i comportamenti sociali. I numeri indicano l'importanza statistica (p) dei fattori valutati in ogni comportamento e le loro interazioni appaiate. AFFIL: Interazioni affiliative; AGG: Interazioni agonistiche (aggressive); STY: Stereotipie.

	AFFIL	AGG	STY
Gruppo	0.010*	<0.001*	<0.001*
Round	<0.001*	0.048*	0.013*
Gruppo x Round	0.002*	0.024*	0.066

Tabella supplementare S30. Indicatori dello stato di benessere del sangue e pannello ematologico nel round estivo. Confronti indipendenti (righe) dei parametri ematici valutati nel round estivo. Per ogni parametro, i numeri nella riga superiore indicano il valore medio per ciascun gruppo \pm errore standard, mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Apici (a, b) indicano differenze statistiche significative tra i gruppi basate su test *post hoc*; Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; A: ANOVA; KW: Kruskal Wallis; We: Welch. CK: Creatina Chinasi; NEFA: Acido grasso non esterificato; rapporto N/L: rapporto Neutrofili/Linfociti; WBC: Globuli bianchi; NE: Neutrofili; EO: Eosinofili; BA: Basofili; LY: Linfociti; MO: Monociti; RBC: Globuli rossi; HG: Emoglobina; HCT: Ematocrito; MCV: Volume Corpuscolare Medio; MCH: Emoglobina Corpuscolare Media; MCHC: Concentrazione Media dell'Emoglobina Corpuscolare.

	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C	p
Cortisolo (nmol/L)	64.27 \pm 9.51 75.30 (44.70-83.60)	75.66 \pm 11.94 72.60 (59.60-76.35)	65.89 \pm 9.94 54.10 (46.90-88.15)	0.953 ^{KW}
CK (UI/L)	156.14 \pm 20.82 143.00 (131.50-173.50)	218.29 \pm 79.79 133.00 (123.00-172.50)	132.29 \pm 25.81 110.00 (98.00-125.50)	0.175 ^{KW}
Glucosio (mg/dl)	47.29 \pm 2.31 49.00 (45.00-51.00)	49.43 \pm 4.06 50.00 (43.00-51.00)	46.57 \pm 3.56 43.00 (40.50-51.50)	0.405 ^A
Lattato (mmol/L)	61.77 \pm 4.60 65.40 (52.95-67.65)	50.29 \pm 8.69 52.50 (40.70-68.10)	64.64 \pm 7.85 63.50 (55.45-67.55)	0.356 ^A
NEFA (mmol/L)	0.27 \pm 0.07 0.20 (0.10-0.40)	0.37 \pm 0.07 0.30 (0.25-0.45)	0.51 \pm 0.16 0.30 (0.30-0.55)	0.324 ^{KW}
Rapporto N/L	0.39 \pm 0.05 0.31 (0.30-0.46)	0.35 \pm 0.02 0.33 (0.32-0.38)	0.48 \pm 0.06 0.49 (0.35-0.61)	0.340 ^{KW}
WBC (10³/mm³)	6.49 \pm 0.58 6.01 (5.61-6.83)	5.21 \pm 0.27 5.32 (4.62-5.41)	6.56 \pm 0.61 6.34 (6.23-6.81)	0.135 ^A
NE (10³/mm³)	1.67 \pm 0.22 1.58 (1.38-1.70)	1.25 \pm 0.06 1.21 (1.13-1.37)	1.94 \pm 0.30 1.85 (1.38-2.19)	0.114 ^A
EO (10³/mm³)	0.29 \pm 0.20 0.09 (0.07-0.15)	0.12 \pm 0.02 0.12 (0.08-0.15)	0.27 \pm 0.06 0.26 (0.15-0.33)	0.081 ^{KW}
BA (10³/mm³)	0.02 \pm 0.00 0.02 (0.01-0.02)	0.02 \pm 0.00 0.02 (0.02-0.03)	0.03 \pm 0.00 0.03 (0.02-0.03)	0.296 ^A
LY (10³/mm³)	4.32 \pm 0.26 4.34 (3.86-4.68)	3.67 \pm 0.22 3.57 (3.24-3.78)	4.16 \pm 0.38 3.82 (3.61-5.06)	0.190 ^{KW}
MO (10³/mm³)	0.18 \pm 0.02 0.16 (0.15-0.18)	0.14 \pm 0.02 0.10 (0.10-0.15)	0.17 \pm 0.02 0.16 (0.16-0.18)	0.224 ^{KW}
RBC (10⁶/mm³)	12.85 \pm 0.42 12.87 (12.13-13.23)	12.75 \pm 0.37 13.26 (12.37-13.38)	12.51 \pm 0.30 12.62 (12.15-13.12)	0.558 ^{KW}
HG (g/dl)	13.64 \pm 0.36 13.90 (13.30-14.00)	13.11 \pm 0.32 12.90 (12.50-13.80)	13.07 \pm 0.18 13.00 (12.70-13.40)	0.336 ^A
HCT (%)	46.89 \pm 1.31 47.30 (45.50-48.90)	45.00 \pm 1.05 44.20 (43.60-45.65)	47.59 \pm 1.42 47.20 (44.65-51.00)	0.351 ^A

MCV	36.59 ± 0.96	35.39 ± 0.91	38.09 ± 1.01	0.152 ^{kw}
	36.05 (35.25-36.46)	34.78 (33.63-36.90)	38.98 (36.72-39.70)	
MCH	10.64 ± 0.16	10.30 ± 0.18	10.48 ± 0.24	0.499 ^A
	10.62 (10.35-10.88)	10.46 (10.04-10.57)	10.32 (10.10-10.81)	
MCHC	29.15 ± 0.61	29.16 ± 0.52	27.64 ± 1.01	0.426 ^{We}
	29.39 (28.80-30.10)	28.96 (28.18-29.51)	26.48 (25.49-29.67)	

Tabella supplementare S31. Indicatori dello stato di benessere del sangue e pannello ematologico nel round invernale. Confronti indipendenti (righe) dei parametri ematici valutati nel round invernale. Per ogni parametro, i numeri nella riga superiore indicano il valore medio per ciascun gruppo \pm errore standard, mentre i numeri nella riga inferiore indicano il valore mediano con lo scarto interquartile. Apici (a, b) indicano differenze statistiche significative tra i gruppi basate su test post hoc; Gruppo A: Controllo; Gruppo B: Solo adiuvante; Gruppo C: Vaccino; A: ANOVA; KW: Kruskal Wallis; We: Welch. CK: Creatina Chinasi; NEFA: Acido grasso non esterificato; rapporto N/L: rapporto Neutrofili/Linfociti; WBC: Globuli bianchi; NE: Neutrofili; EO: Eosinofili; BA: Basofili; LY: Linfociti; MO: Monociti; RBC: Globuli rossi; HG: Emoglobina; HCT: Ematocrito; MCV: Volume Corpuscolare Medio; MCH: Emoglobina Corpuscolare Media; MCHC: Concentrazione Media dell'Emoglobina Corpuscolare.

	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C	
Cortisolo (nmol/L)	21.27 ^a \pm 5.64 15.60 (10.15-28.85)	58.37 ^b \pm 10.55 64.30 (40.40-75.75)	62.40 ^b \pm 8.37 58.20 (46.35-71.60)	0.005 ^{A*}
CK (UI/L)	490.43 \pm 262.10 154.00 (147.00-424.00)	416.14 \pm 148.47 158.00 (149.00-674.50)	326.00 \pm 201.63 130.00 (117.50-145.50)	0.151 ^{KW}
Glucosio (mg/dl)	62.29 \pm 0.99 63.00 (60.50-63.00)	63.86 \pm 2.85 61.00 (59.50-68.00)	66.00 \pm 1.35 68.00 (63.50-68.50)	0.266 ^{KW}
Lattato (mmol/L)	24.81 \pm 3.39 22.70 (18.30-30.70)	31.70 \pm 3.51 30.00 (24.15-39.50)	35.13 \pm 5.13 43.20 (26.55-45.45)	0.220 ^A
NEFA (mmol/L)	0.11 \pm 0.01 0.10 (0.10-0.10)	0.19 \pm 0.05 0.10 (0.10-0.25)	0.19 \pm 0.04 0.20 (0.10-0.20)	0.251 ^{KW}
Rapporto N/L	0.47 \pm 0.05 0.44 (0.36-0.57)	0.39 \pm 0.02 0.41 (0.37-0.44)	0.49 \pm 0.08 0.45 (0.39-0.61)	0.449 ^A
WBC (10³/mm³)	5.96 ^b \pm 0.30 6.00 (5.25-6.61)	5.68 ^b \pm 0.24 5.65 (5.37-5.86)	7.01 ^a \pm 0.51 7.16 (6.26-7.84)	0.047 ^{A*}
NE (10³/mm³)	1.78 \pm 0.17 1.71 (1.38-2.16)	1.49 \pm 0.06 1.47 (1.37-1.60)	2.06 \pm 0.30 1.96 (1.60-2.71)	0.129 ^{Wl}
EO (10³/mm³)	0.16 \pm 0.06 0.09 ^b (0.08-0.16)	0.16 \pm 0.03 0.11 ^b (0.11-0.21)	0.36 \pm 0.05 0.37 ^a (0.28-0.44)	0.016 ^{KW*}
BA (10³/mm³)	0.02 \pm 0.00 0.02 (0.01-0.02)	0.03 \pm 0.00 0.03 (0.02-0.04)	0.02 \pm 0.00 0.02 (0.01-0.02)	0.218 ^A
LY (10³/mm³)	3.86 \pm 0.19 3.94 (3.56-4.12)	3.88 \pm 0.23 3.71 (3.59-3.95)	4.45 \pm 0.42 4.27 (3.69-5.41)	0.474 ^{Wl}
MO (10³/mm³)	0.13 \pm 0.02 0.15 (0.09-0.15)	0.11 \pm 0.02 0.13 (0.07-0.14)	0.12 \pm 0.02 0.13 (0.09-0.14)	0.161 ^A
RBC (10⁶/mm³)	11.77 \pm 0.47 12.24 (10.97-12.73)	11.73 \pm 0.30 11.92 (11.10-12.34)	11.52 \pm 0.42 11.53 (10.96-12.32)	0.891 ^A
HG (g/dl)	12.94 \pm 0.42 13.20 (12.30-13.55)	12.56 \pm 0.30 12.30 (11.90-13.20)	12.39 \pm 0.37 12.10 (11.60-12.80)	0.557 ^A
HCT (%)	43.46 \pm 1.11 44.30 (42.05-44.90)	41.84 \pm 0.83 41.50 (41.05-43.55)	43.86 \pm 1.33 43.80 (41.85-45.50)	0.414 ^A
MCV	37.12 \pm 1.11 36.36 (35.68-37.43)	35.78 \pm 1.05 35.16 (33.72-37.38)	38.27 \pm 1.28 38.50 (36.66-40.46)	0.332 ^A

MCH	11.03 ± 0.21	10.72 ± 0.18	10.79 ± 0.27	0.601 ^A
	11.06 (10.62-11.41)	10.74 (10.56-10.99)	10.71 (10.21-11.17)	
MCHC	29.77 ± 0.51	30.03 ± 0.60	28.37 ± 1.09	0.447 ^{KW}
	30.21 (29.62-30.53)	29.79 (28.99-30.80)	27.82 (26.06-30.59)	

Figura supplementare S1. A. Controllo (Gruppo A, agnello N. 1). B-D. Animali vaccinati con aree multifocali di perdita di pelo e depilazione. B-C. Vaccino (Gruppo C, agnello N. 1). Scarso aspetto esterno con aree di perdita di lana nel collo (cancelletto) e groppa (asterisco). D. Vaccinati (Gruppo C, agnello N. 6). Area focale di perdita di lana nella groppa.

