

اثر توازن کاتیون- آنیون مثبت و منفی در جیره تلیسه‌های هلشتاین نزدیک زایش بر عملکرد، متابولیت‌های خونی و ایمنوگلوبولین‌های آغوز

وحید غلامحسینی^۱، مهدی کاظمی بن چناری^{۲*}، مهدی خدایی مطلق^۳ و محمدحسین مرادی^۳
۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۲۷)

چکیده

استفاده از مکمل‌های آنیونیک در جیره تلیسه‌های آبستن به منظور ایجاد توازن کاتیون- آنیون منفی در جیره‌نویسی گاوهای شیری همچنان سوال برانگیز است. به این منظور تعداد ۱۲ رأس تلیسه آبستن هلشتاین 21 ± 7 روز مانده به زایش در جایگاه‌های انفرادی در قالب طرح کاملاً تصادفی به یکی از دو تیمار آزمایشی اختصاص یافتند (هر تیمار با ۶ تکرار). تیمارها شامل: ۱) جیره با اختلاف DCAD برابر $+165$ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم و ۲) جیره با DCAD برابر -85 میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم ماده خشک بودند. ماده خشک مصرفی انفرادی، آغوز تولیدی و ایمنوگلوبولین‌های آغوز، شیر و ترکیبات آن، به همراه متابولیت‌های خونی (پیش و پس از زایش) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد ماده خشک مصرفی دام‌ها تحت‌تأثیر تیمارها قرار نگرفت. pH خون در قبل از زایش در تیمار با DCAD منفی کاهش یافت. در بین متابولیت‌های خون، تنها غلظت کلسیم خون در تیمار با DCAD منفی افزایش یافت و این در حالی بود است که تیمار با DCAD مثبت نیز افت کلسیم را تجربه نکرد. مقدار آغوز تولیدی، چربی و پروتئین شیر، ایمنوگلوبولین‌های M و A آغوز، امتیاز وضعیت بدنی دام‌ها تحت تأثیر قرار نگرفتند. تنها ایمنوگلوبولین G در خون و آغوز مربوط به تلیسه‌های مصرف‌کننده جیره با DCAD منفی افزایش داشت. به‌طور خلاصه نتایج نشان داد ایمنوگلوبولین G در سرم و آغوز تلیسه‌هایی که جیره با DCAD منفی دریافت کرده بودند افزایش نشان داد و پژوهش‌های بیشتری به منظور بررسی تأثیر DCAD منفی بر تلیسه‌های انتظار زایش درگیر شرایط تنش موردنیاز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اختلاف کاتیون- آنیون جیره، ایمنی آغوز، تلیسه انتظار زایش، مکمل آنیونیک.

Effects of positive and negative dietary cation-anion difference in close-up Holstein heifers on performance, blood metabolites and immunoglobulin of colostrum

Vahid Gholamhoseini¹, Mehdi Kazemi-Bonchenari^{2*}, Mahdi Khodaei-Motlagh² and Mohammad Hossein Moradi³
1, 2, 3. Former M.Sc. Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science, Arak University, Iran
(Received: Jun. 2, 2019 - Accepted: Dec. 18, 2019)

ABSTRACT

Supplementing anionic salts to make negative DCAD in close-up heifers' diets is still a challenging topic in formulation of dairy cattle rations. Twelve close-up Holstein heifers (21 ± 7 d expected to calving date) were fed individually and allocated to two treatments of 6 animals each. Experimental treatments were; 1) positive DCAD with level of $+165$ meq/kg basis on dry matter; and 2) negative DCAD with the level of -85 meq/kg basis on dry matter. Dry matter intake (DMI), milk yield and composition, colostrum yield and its immunoglobulins content and some blood metabolites (pre- and post-partum) were evaluated. The results show that DMI was similar between treatments. The blood pH was lesser in negative-DCAD fed heifers. Among blood metabolites, only Ca was increased in negative-DCAD fed heifers. Colostrum and milk yield and milk composition, colostrum concentrations of IgM and IgA were similar between treatments. However, serum and colostrum concentrations of IgG were slightly increased in negative-DCAD fed heifers; a further research should be carried out to elaborate on the effects of using negative-DCAD rations in close-up heifers exposed to stressful conditions.

Keywords: Anionic salts, colostrum immunity, dietary cation- anion difference.

* Corresponding author E-mail: m-kazemibonchenari@araku.ac.ir; mehdi_kazemi59@yahoo.com

مقدمه

در بعد زایش نسبت به گاوهای چند شکم‌زا کرده بیشتر است و افت کلسیم خون آن‌ها شدید نمی‌باشد. ولی سطح کلسیم خون گاوهای چند شکم‌زا به دلیل خروج کلسیم بالا به دلیل تولید شیر در دوره شیردهی قبلی سبب قابلیت افت کلسیم در این دام‌ها می‌شود (Van Mosel *et al.*, 1993). اما در بسیاری از موارد در دامداری‌ها حتی در گله‌های صنعتی نیز بهاریند نگهداری تلیسه‌های نزدیک زایش با گاوهای نزدیک زایش (کلوزآپ) یکسان بوده و تلیسه‌ها نیز به اجبار از این مکمل‌های آنیونیک استفاده می‌کنند. گذشته از این‌که این مکمل‌ها می‌توانند هزینه فراوانی به همراه داشته باشند و ارزش افزوده آن‌ها در زمان استفاده در تلیسه‌ها مشخص نیست؛ از نظر فیزیولوژیکی نیز استفاده از این نمک‌های آنیونی در تلیسه‌های آبستن سوال برانگیز است. افت اشتها در تلیسه‌های تازه‌زا (گاوهای زایش اول) می‌تواند تأثیر شدیدی بر توازن انرژی در بعد زایش داشته باشد (Grummer *et al.*, 2004) و یکی از پیامدهای استفاده از نمک‌های آنیونی افت اشتها به دلیل عدم خوش خوراکی آنها می‌باشد (Horst *et al.*, 1994). بنابراین در صورت افت اشتها در تلیسه‌های نزدیک زایش که با گاوهای چند شکم زایش کرده در یک بهاریند نگهداری می‌شوند تأثیر منفی بر دوره تولیدی نیز خواهد داشت. از طرف دیگر، پیش‌تر مشخص شده است که غلظت کمتر کلسیم می‌تواند سبب تضعیف سیستم ایمنی گردد (Grafton & Thwaite, 2001) همچنین سطح ایمنوگلوبولین‌های آغوز در گاوهای زایش اول کمتر از گاوهای چند شکم‌زا است به گونه‌ای که در گاوهای زایش اول ۵/۶۸ درصد و در گاوهای سه بار زایش ۷/۹۱ درصد از کل پروتئین ایمنوگلوبولین‌ها بوده‌اند (Muller & Ellinger, 1981) بنابراین به نظر می‌رسد که در صورت تأثیر مثبت نمک‌های آنیونی بر غلظت کلسیم در تلیسه‌های نزدیک زایش کیفیت آغوز تولیدی این گروه ممکن است تحت تأثیر قرار گیرد. بنابراین با در نظر گرفتن جنبه‌های مثبت و منفی استفاده از نمک‌های آنیونی (DCAD مثبت و منفی)، استفاده از این ترکیبات در تلیسه‌های نزدیک زایش نیاز به پژوهش بیشتری خواهد داشت تا نتایج برای دامداری‌های صنعتی برای

متابولیسم مواد معدنی در حول و حوش زایش در گاوهای شیری نقش به‌سزایی داشته و اختلال در متابولیسم هر کدام از مواد معدنی می‌تواند سبب ایجاد مشکلات متفاوت و حتی در نهایت حذف دام گردد. در این میان کلسیم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با این‌که کلسیم به‌صورت مستقیم در محاسبه توازن اسید و باز بدن در گاوهای شیری به‌کار نرفته است و چهار یون اصلی دخیل و مؤثر در توازن اسید و باز شامل گوگرد، فسفر، سدیم و پتاسیم می‌باشند اما از طرفی بیشترین تأثیرپذیری را از این توازن، کلسیم خواهد داشت و تغییرات این توازن در حوالی زایش می‌تواند بر غلظت کلسیم و در نهایت عملکرد دام تأثیر بگذارد (Sanchez, 2003). بنابراین اختلاف کاتیون- آنیون جیره بر تعادل اسید- باز در نشخوارکنندگان (Tucker *et al.*, 1988)، عملکرد شیردهی (Tucker *et al.*, 1988) و متابولیسم کلسیم در گاوهای شیری (Block, 1984; Oetzel and Barmore, 1993) مؤثر است. تغذیه جیره‌هایی با سطح اختلاف کاتیون- آنیون منفی در ۲۱ روز آخر آبستنی یک راهکار عملی تغذیه‌ای برای افزایش کلسیم خون و تولید شیر بیشتر پس از زایش است که البته بیشتر در گاوهای شیری چند شکم‌زا مورد توجه قرار گرفته است (Horst *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 1997). بسیاری از محققان با استفاده از نمک‌های آنیونی برای کاهش سطح اختلاف کاتیون- آنیون جیره گاوهای شیری پیش از زایش، کاهش وقوع هیپوکلسیمی را مشاهده نمودند (Moore *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2008). استفاده از نمک‌های آنیونی ۱۴ تا ۲۱ روز قبل از زایمان تا زمان زایش در دوره انتقال علاوه بر این‌که سبب بهبود وضعیت کلسیم در گاوهای شیری شده است تولید شیر را نیز، سه تا هفت درصد افزایش داده است (Goff & Horst, 1998). القای DCAD منفی باعث اسیدوز خفیف در گاو در دوره انتظار زایش سبب کمک به برداشت کلسیم از استخوان‌های دام در بعد زایش گردد که به همین جهت از تب شیر بالینی و تحت- بالینی و نیز تضعیف سیستم ایمنی جلوگیری کند. در گاوهای یک بار زایش کرده، معمولاً سطح کلسیم خون

استفاده گردید. جیره پایه مربوط به دوره نزدیک زایش و جیره گاوهای تازه‌زا به‌همراه آنالیز شیمیایی آنها در جدول ۱ ارائه شده است. خوراک‌دهی در دو نوبت صبح و بعدازظهر به ترتیب در ساعت‌های ۰۸:۰۰ و ۱۶:۰۰ به‌صورت TMR انجام گرفت. مکمل آنیونیک مصرفی در فرمول پایه کنسانتره قرار گرفته بود. جیره غذایی و آب به‌صورت آزاد در اختیار دام‌ها قرار داشت.

ثبت داده‌ها، آنالیزهای شیمیایی و بیوشیمیایی

میزان خوراک مصرفی هر حیوان پس از کسر خوراک ریخته شده در آخور از خوراک باقیمانده در آخور تلیسه‌ها به‌صورت روزانه در دو دوره قبل و بعد زایش اندازه‌گیری شد. برای آنالیز داده‌های ماده خشک مصرفی که به‌صورت انفرادی اندازه‌گیری شده بود. داده‌های قبل زایش (حداقل ۱۲ روز و حداکثر ۲۳ روز براساس زایش انجام شده دام‌ها) استفاده گردید. ماده خشک مصرفی دام‌ها بعد زایش نیز از روز زایش تا ۱۴ روز بعد زایش برای آنالیز آماری در نظر گرفته شد. ماده خشک جیره مخلوط (TMR) مصرفی یک بار در قبل و یک بار در بعد زایش مشخص گردید و مقدار به‌دست‌آمده برای تصحیح مصرف ماده خشک صورت گرفته مورد استفاده قرار گرفت. امتیاز وضعیت بدنی گاوها در قبل و بعد از زایش (با استفاده از روش امتیازبندی ۵ نمره‌ای (۱= بسیار لاغر و ۵= بسیار چاق) ثبت شد (Ferguson et al., 1994).

در روز سوم قبل از زمان زایش (زمان مورد انتظار) و همچنین روز سوم بعد از زایش خون‌گیری صورت گرفت. نمونه‌های خون از سیاهرگ دمی چهار ساعت بعد از مصرف خوراک صبح و با استفاده از لوله‌های ونوجکت هپارین‌دار تحت خلأ گرفته شد. نمونه‌های خون بلافاصله پس از خون‌گیری به آزمایشگاه انتقال داده شد و توسط دستگاه سانتریفوژی با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و پلاسما آن جدا شده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری pH خون، نمونه تازه خون‌ها (بدون هپارین) همراه با یخ به آزمایشگاه دامپزشکی اراک ارسال گردید. برای اندازه‌گیری متابولیت‌های پلاسما، بعد از باز شدن پلاسما از فریز فراسنجه‌های

نگهداری تلیسه‌های نزدیک زایش قابل توصیه باشد. بنابراین هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر سطح مثبت و منفی DCAD جیره (مثبت؛ +۱۶۵ و منفی؛ -۸۵ میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم) در تلیسه‌های نزدیک زایش بر مصرف خوراک انفرادی، تولید شیر و ترکیبات آن، زمان دفع جفت و وزن تولد گوساله‌ها، ایمنوگلوبولین‌های آغوز و متابولیت‌های خون و آنزیم‌های کبدی (ALT و AST)، بود.

مواد و روش‌ها

محل انجام آزمایش، دام‌های آزمایشی و تیمارها

پژوهش حاضر در ایستگاه دامپروری گروه علوم دامی دانشگاه اراک انجام شد. به این منظور تعداد ۱۲ رأس تلیسه آبستن نژاد هلشتاین با میانگین سن ۲۲/۸ ماه و با میانگین 21 ± 7 روز مانده به زایش (مورد انتظار براساس تاریخ زمان تلقیح به‌همراه تأیید با انجام تست آبستنی سنگین توسط دامپزشک) در جایگاه‌های انفرادی با خوراک خوری و آبشخوری مجزا مورد استفاده قرار گرفتند. تلیسه‌های هر دو تیمار بعد از زایش جیره یکسانی دریافت کردند. جیره‌های قبل و بعد از زایش توسط نرم افزار 2001 NRC تنظیم شدند. تلیسه‌ها به دو گروه مجزا تقسیم بندی شدند (در هر گروه شش رأس دام) و به‌صورت انفرادی تغذیه شدند. جیره‌های قبل زایش (کلوزآپ) از نظر سطح DCAD متفاوت بودند و در جیره با DCAD مثبت سطح آن برابر +۱۶۵ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم بود و در جیره با DCAD منفی سطح آن برابر -۸۵ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم ماده خشک بود. جیره بعد زایش برای هر دو گروه یکسان بود و سطح DCAD مشابه (۲۷۳+ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم) داشت. تمامی اقلام جیره و سطح مصرفی آنها در دو تیمار یکسان بود با این تفاوت که در تیمار گروه اول از مکمل ویتامینی- معدنی (بدون نمک‌های آنیونی) و در تیمار گروه دوم از مکمل آنیونیک استفاده گردید. برای منفی کردن DCAD مواد معدنی با ترکیب کلرید آمونیوم حاوی بنیان کلر (۰/۳۴) در برابر ۰/۸۸ درصد در ماده خشک) و ترکیب گوگرد میکرونیزه با خلوص ۹۹ درصد (۰/۱۹) در برابر ۰/۳ درصد در ماده خشک)

استفاده‌شده در این مطالعه برای داده‌هایی که تکرار در واحد زمان نداشته‌اند (مدت زمان مربوط به دفع جفت بعد زایش، امتیاز وضعیت بدنی دام‌های آزمایشی) به صورت زیر بود (مدل ۱):

$$y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij} \quad (1)$$

اجزای مدل شامل y_{ij} که به‌عنوان فراسنجه مورد نظر، μ میانگین، T_i اثر تیمار (سطح DCAD مورد آزمایشی که برابر ۱۶۵+ در برابر ۸۵- میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم بود) و ε_{ij} اثر خطای آزمایش بود.

جدول ۱. ارقام مواد خوراکی مورد استفاده در جیره‌های آزمایشی (براساس درصد از ماده خشک) و ترکیب مواد مغذی جیره‌های آزمایشگاهی

Table 1. The percentages of feed ingredients (DM basis) and nutritive value of the experimental diets

Ingredients	Treatments ¹	
	P-DCAD	N-DCAD
Alfalfa Hay	30	30
Corn silage	13	13
Wheat straw	4.7	4.7
Barely grain	30	30
Wheat bran	9	9
Soybean meal	12	12
Vit-Min Premix ²	1.3	0
Anionic salt supplement ³	0	1.3
Chemical analysis (g/kg DM)		
Net energy ⁴ , Mcal/kg	1.51	1.51
Crude protein ⁵ , % DM	14.5	14.5
Neutral detergent fiber ⁴ , % DM	36.4	36.4
Calcium ⁴ , % DM	0.8	0.8
Phosphorus ⁴ , % DM	0.4	0.4
Sodium ⁴ , % DM	0.10	0.10
Potassium ⁴ , % DM	1.2	1.2
Chlorine ⁴ , % DM	0.34	0.88
Sulfur ⁴ , % DM	0.19	0.30
Copper ⁴ , mg/kg	18.5	18.5
Iron ⁴ , mg/kg	135	135
Manganese ⁴ , mg/kg	44	44
Zinc ⁴ , mg/kg	72	72
DCAD, Meq/kg	+165	- 85

1. Treatments were; P-DCAD; positive dietary cation-anion difference equal to + 165 meq/kg; N-DCA: negative dietary cation-anion difference equal to -85 meq/kg.

2. Min-Vit premix contained per kilogram of supplement; 1,000,000 IU vitamin A, 3,000 IU vitamin E, 500,000 IU vitamin D₃, 2000 mg Cu, 3000 mg Fe, 1500 mg Mn, 3000 mg Zn, 40 g Mg, 30 mg Co, 100 mg Se, 110 g Ca, 50 g P.

3. Anionic salt supplement contained per kilogram of supplement; 1,000,000 IU vitamin A, 3,000 IU vitamin E, 500,000 IU vitamin D₃, 2000 mg Cu, 3000 mg Fe, 1500 mg Mn, 3000 mg Zn, 40 g Mg, 30 mg Co, 100 mg Se, 110 g Ca, 50 g P, 30,000 mg S, and 110,000 mg Cl.

4. Values calculated based on NRC 2001.

5. Values are measured in laboratory based on chemical analysis.

برای داده‌هایی که تکرار در واحد زمان داشته‌اند (مانند ماده خشک مصرفی در پیش و پس از زایش، تولید شیر مصرفی و ترکیبات آن، ایمونوگلوبولین‌های آغوز) مدل (۲) توسط رویه MIXED استفاده قرار گرفت.

گلوکز (اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۴۶ نانومتر)، اسیده‌های چرب استریفه‌نشده (کیت‌های NEFA HRD، شرکت مواد شیمیایی Wake، هامبورگ، آلمان)، بتاهیدروکسی بوتیرات (اسپکتروفوتومتر در طول موج ۳۲۰ نانومتر، کیت‌های RANDOX، کشور انگلستان)، پروتئین کل، آلبومین، تری‌گلیسرید (اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۰۰ تا ۵۴۶ نانومتر)، کلسترول (اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۴۶ نانومتر)، کلسیم، فسفر، آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در نمونه‌های قبل و بعد زایش اندازه‌گیری گردید. غلظت ایمونوگلوبولین G نیز در خون تلیسه‌ها در بعد و قبل از زایش اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین از روش نفلومتری با دستگاه نفلومتر (Nephelometer, UK) و کیت‌های بایندینگ ساید (Binding Side, UK) ساخت کشور انگلستان استفاده گردید. زمان دفع جفت گاوها و همچنین وزن تولد گوساله‌ها نیز بعد از زایش ثبت گردید. بلافاصله بعد زایش گاوها حجم و آغوز تولیدی اندازه‌گیری گردید. بعد از دوشش کل آغوز و مشخص شدن حجم آن، دو نمونه برای اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین‌های آن (A، M و G) و همچنین کل ایمونوگلوبولین‌ها (total Ig) برداشت گردید. نمونه‌ی آغوز تلیسه‌ها بعد زایش در دو تیمار برای تعیین ایمونوگلوبولین‌های A، M و G به آزمایشگاه رازی اراک ارسال گردید. روش اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین موجود در آغوز همانند روش اندازه‌گیری در خون بود. گاوها هر روز برای شیردوشی با فاصله هشت ساعت به سالن شیردوشی هدایت شدند و تولید شیر هر وعده ثبت تا تولید شیر کل روز ثبت شود. ثبت تولید شیر تا ۱۴ روز بعد زایش صورت گرفت. برای اندازه‌گیری ترکیبات شیر نیز به نسبت تولید شیر در وعده‌های مختلف حجم خاصی از شیر تهیه شد و ترکیبات شیر در آزمایشگاه توسط دستگاه میلکواسکن Foss مدل S50 ساخت کشور دانمارک اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری داده‌ها

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) توسط رویه GLM انجام شد. مدل آماری

مطالعه حاضر با کاهش اختلاف کاتیون- آنیون جیره، ماده خشک مصرفی در قبل و بعد از زایمان تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. در آزمایش‌های دیگری مانند *Joyce et al.* (1997) کاهش سطح DCAD در گاوهای چند شکم‌زا سبب تأثیر منفی بر ماده خشک مصرفی شد. به نظر می‌رسد وجود چنین اختلافی در ماده خشک مصرفی ناشی از کاهش شدیدتر DCAD بوده باشد. نتیجه این مطالعه برخلاف نتایج به‌دست‌آمده توسط *DeGroot et al.* (2010) می‌باشد؛ آنها نشان دادند که با کاهش اختلاف کاتیون- آنیون جیره، ماده خشک مصرفی در گاوهای انتظار زایمان چند شکم‌زا کرده کاهش یافت اما در زمان بعد زایش کاهشی مشاهده نشد. در همین راستا *Jones et al.* (2008) نیز آثار منفی کاهش اختلاف کاتیون- آنیون جیره را روی ماده خشک مصرفی گزارش کردند.

جدول ۳. اثر توازن کاتیون- آنیون مثبت و منفی در تلیسه‌های

کلوزآپ هلشتاین بر مصرف خوراک پیش و پس از زایش،

تولید و ترکیبات شیر، تغییر امتیاز بدنی و زمان خروج جفت
 Table 3. Effect of positive or negative dietary DCAD in close-up Holstein heifers on pre- and post-partum intake, milk yield and composition, body condition score changes and placenta expelled out

Item	Treatments ¹		SEM	P-value
	P-DCAD	N-DCAD		
Prepartum DMI, kg/d	11.37	10.19	0.74	0.18
Postpartum DMI, kg/d	16.76	17.27	0.69	0.38
Milk yield, kg/d	24.7	25.6	0.92	0.34
BCS changes	0.60	0.51	0.13	0.63
Fat, %	4.09	3.98	0.19	0.71
Protein, %	3.15	3.21	0.03	0.14
Fat yield, kg/d	1.01	1.01	0.01	0.98
Protein yield, kg/d	0.778	0.821	0.02	0.24
Placenta expelled out, hour after calving	11.40	8.20	1.18	0.09
Calf birth weight, kg	35.80	37.10	1.26	0.46

1. Treatments were; P-DCAD; positive dietary cation-anion difference equal to +165 meq/kg DM; N-DCA: negative dietary cation-anion difference equal to -85 meq/kg DM.

به نظر می‌رسد چنانچه اختلاف کاتیون- آنیون جیره به کمتر از ۳۰۰ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم برسد آثار منفی بروز می‌کند و ممکن است تلیسه‌ها نسبت به گاوها به این موضوع حساس‌تر باشند (*Tucker et al.*, 1991; *Moore et al.*, 2000). غالباً تغییر طعم جیره می‌تواند به‌عنوان عامل مهم کاهش خوراک مصرفی در گاوها باشد و همچنین در کنار آن نیز تغییر شدید توازن اسید- باز

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + T_j + Z_k + ZT_{jk} + \varepsilon_{ijkl} \quad (2)$$

اجزای مدل ذکرشده شامل Y_{ijkl} که به‌عنوان فراسنجه مورد نظر، μ میانگین، A_j اثر دام مورد آزمایشی، T_i اثر تیمار (سطح DCAD مورد آزمایشی که برابر ۱۶۵+ در برابر ۸۵- میلی‌اکی‌والان در کیلوگرم بود)، Z_k اثر زمان نمونه‌گیری (تکرار در واحد زمان)، ZT_{jk} اثر متقابل بین تیمار و زمان نمونه‌گیری و ε اثر خطای آزمایش بود. برای بهبود یکدستی (هموزنتی) داده‌های مربوط به زمان دفع جفت (براساس ساعت) و وزن تولد گوساله‌ها داده‌های این فراسنجه به‌صورت توان دوم محاسبه و آنالیز گردید. میانگین حداقل مربعات مورد بررسی قرار گرفته و براساس مقدار p-Value سطح معنی‌داری در کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدول ۲. اقلام مواد خوراکی مورد استفاده و ترکیب مواد

مغذی جیره بعد زایش

Table 2. The percentages of feed ingredients (DM basis) and nutritive value of the postpartum diet

Ingredients	Postpartum diet
Alfalfa Hay	20
Corn silage	14
Barely grain	39
Wheat bran	4.5
Soybean meal	20
White salt	0.5
Sodium bicarbonate	0.6
Vit-Min Premix ¹	1.4
Chemical analysis (g/kg DM)	
Net energy, Mcal/kg	1.71
Crude protein, % DM	16.9
Neutral detergent fiber, % DM	30.2
Calcium, % DM	0.8
Phosphorus, % DM	0.4
Sodium, % DM	0.19
Potassium, % DM	1.48
Chlorine, % DM	0.29
Sulfur, % DM	0.17
Copper, mg/kg	21.2
Iron, mg/kg	152
Manganese, mg/kg	53
Zinc, mg/kg	83
DCAD, Meq/kg	+273

1. Min-Vit premix for fresh heifers contained per kilogram of supplement 1500.000 IU vitamin A, 6.000 IU vitamin E, 600.000 IU vitamin D₃, 3000 mg Cu, 3000 mg Fe, 2000 mg Mn, 4000 mg Zn, 40 g Mg, 20 g Na, 50 mg Co, 120 mg Se, 90 g Ca and 60 g P.

نتایج و بحث

عملکرد دام‌های آزمایشی و سطح ایمنی آغوز

اثر سطح اختلاف کاتیون- آنیون جیره بر ماده خشک مصرفی قبل و بعد از زایش، مقدار شیر تولیدی و ترکیبات شیر، تغییرات امتیاز وضعیت بدنی، زمان خروج جفت، و وزن تولد گوساله‌ها در جدول ۳ آمده است. در

تأثیری از سطح DCAD جیره‌های آزمایشی در دوره انتظار زایش نداشتند. به نظر می‌رسد با توجه به عدم تغییر ماده خشک مصرفی و همچنین سطح متابولیت‌های خون (جدول ۵) عدم تغییر ترکیبات شیر نیز منطقی به نظر می‌رسد. معمولاً در مطالعه‌هایی که نمک‌های آنیونی بر ماده خشک مصرفی تأثیر داشته‌اند، مقدار شیر و ترکیبات شیر نیز تحت تأثیر قرار گرفته‌اند. علی‌رغم این‌که تعداد تکرار در آزمایش حاضر کم بود، اما زمان خروج جفت نیز گزارش گردید و برای تأیید این داده‌ها نیاز به آزمایش‌های دیگر با تعداد دام بیشتر می‌باشد. زمان خروج جفت در تلیسه‌هایی که DCAD جیره آنها منفی بود تمایل به کاهش داشت ($P=0/09$). به نظر می‌رسد این تغییر تحت تأثیر سطح بالاتر کلسیم در تلیسه‌هایی است که مکمل آنیونیک مصرف کرده‌اند (جدول ۵). همان‌طور که ذکر شد با این تکرار کم در آزمایش حاضر نمی‌توان قاطعانه در مورد تأثیر DCAD بر زمان خروج جفت نظر داد، اما به‌طور کلی مشخص شده که سطح بالاتر کلسیم سبب افزایش انقباضات رحم شده و خروج جفت را تسریع می‌کند. البته قابل ذکر است که زمان دفع جفت تلیسه‌هایی که جیره با سطح DCAD مثبت دریافت کرده بودند نیز براساس داده‌های کلینیکی جفت ماندگی چندان بالا نبوده (زیر ۱۸ ساعت دفع جفت) و در هیچ کدام از گروه‌های آزمایشی اثری از جفت ماندگی مشاهده نشد. این مطلب نشان‌دهنده این است که علی‌رغم تأثیر مثبت کلسیم بالاتر در تلیسه‌هایی که جیره با DCAD منفی دریافت کرده بودند اما سطح مثبت DCAD نیز همراه با افت کلسیم نبوده است و سطح کلسیم در دامنه طبیعی بوده است (Goff & Horst, 1998) که نتوانسته است تأثیر منفی بر دفع جفت داشته باشد. از طرف دیگر عامل مهم دیگر در دفع جفت سطح انرژی بدن می‌باشد که سطح انرژی پایین بدن می‌تواند دفع جفت را با تاخیر مواجه کند و همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود سطح بتاهیدروکسی بوتیرات در تلیسه‌هایی که سطح DCAD مثبت مصرف کرده‌اند افزایش جزئی داشته است که شاید نشان‌دهنده سطح پایین تر انرژی نسبت به تلیسه‌های گروه مصرف‌کننده مکمل‌های آنیونیک بوده است.

بدن بر اشتها می‌تواند تأثیر منفی داشته باشد. در هر حال با توجه به این‌که ممکن است قدرت آزمون مربوط به صفت ماده خشک مصرفی در آزمایش حاضر به دلیل تعداد کم دام بالا نباشد؛ در پژوهش‌های بعدی بررسی تأثیر DCAD بر تلیسه‌های انتظار زایش نیاز به تعداد تکرار بالا دارد. تغییرات امتیاز بدنی و وزن تولد گوساله‌ها تفاوت معنی‌داری در بین دو تیمار در آزمایش حاضر نشان نداد. با توجه به این‌که تلیسه‌های استفاده‌شده در این آزمایش دارای امتیاز بدنی در دامنه طبیعی بودند و با افت اشتها نیز مواجه نگردیدند عدم تغییر امتیاز وضعیت بدنی منطقی به نظر می‌رسد. به نظر می‌رسد تأثیر استفاده نمک‌های آنیونی در تلیسه‌هایی که امتیاز بدنی بالاتر دارند (بالاتر از $3/75$) بر تغییر امتیاز بدنی و خوراک مصرفی نیاز به پژوهش بیشتری داشته باشد.

در مطالعه حاضر میزان شیر تولیدی در دام‌های دو تیمار تفاوت معنی‌داری نداشتند که همسو با نتایج *Melendez et al.* (2003) بود. این محققین گزارش کردند خوراندن مکمل‌های کلسیمی در زمان زایش به گاوهای تغذیه شده با نمک‌های آنیونی در پیش از زایمان با تفاوت کاتیون- آنیون برابر 80 - میلی‌اکی‌والان در هر کیلوگرم ماده خشک تولید شیر در یک دوره شیردهی کامل (305 روز) تحت تأثیر قرار نداد. در راستای همین موضوع نتایج *Dhiman et al.* (1999) نشان داد که خوراندن کلرید کلسیم به‌صورت ژل یا نوشانیدن، تولید شیر را در چهار هفته اول شیردهی تحت تأثیر قرار نداد. البته برخلاف این یافته در آزمایشی گاوهای چندشکم‌زا که جیره آنیونیک (کلسیم کلراید) در قبل از زایش دریافت کرده بودند افزایش معنی‌داری در تولید شیر نشان دادند بدون این‌که کیفیت شیر تغییر یابد؛ میانگین تولید شیر در اوج تولید برای گروه شاهد $43/8$ کیلوگرم در روز بود درحالی‌که با تغذیه جیره آنیونیک (تأمین‌شده از کلسیم کلراید) در دوره کلوزآپ، تولید شیر به $47/8$ کیلوگرم در روز رسید (Giulio et al., 2005). به نظر می‌رسد براساس نتایج به‌دست‌آمده تأثیر مکمل آنیونیک بر ماده خشک مصرفی و یا تولید شیر در گاوهای چند شکم‌زا بیشتر از گاوهای شکم اول می‌باشد. سطح چربی و سطح پروتئین شیر (براساس درصد و مقدار تولیدی) نیز

جدول ۴. اثر توازن کاتیون- آنیون مثبت و منفی در تلیسه‌های کلوزآپ هلشتاین بر حجم آغوز تولیدی و غلظت ایمنوگلوبولین‌های M، A و G و مجموع غلظت ایمنوگلوبولین‌های آغوز

Table 4. Effect of positive or negative dietary DCAD in close-up Holstein heifers on colostrum volume and its individual (Ig M, Ig A, and Ig G) and total immunoglobulin concentration

Item	Treatments ¹		SEM	P-value
	P-DCAD	N-DCAD		
Colostrum volume, L/d	9.26	9.64	0.50	0.63
Total Ig, mg/ml	145.30	158.95	0.34	0.06
Individual immunoglobulins, mg/ml				
Immunoglobulin M	2.17	1.82	0.18	0.23
Immunoglobulin A	2.61	2.63	0.15	0.94
Immunoglobulin G	140.5 ^b	154.5 ^a	0.35	0.02

1. Treatments were; P-DCAD; positive dietary cation-anion difference equal to + 165 meq/kg DM; N-DCA: negative dietary cation-anion difference equal to -85 meq/kg DM.

جدول ۵. اثر توازن کاتیون- آنیون مثبت و منفی در تلیسه‌های کلوزآپ هلشتاین بر pH خون، غلظت متابولیت‌ها و کلسیم و فسفر خون و غلظت آنزیم‌های کبدی پیش و پس از زایش

Table 5. Effect of positive or negative dietary DCAD in close-up Holstein heifers on blood pH, metabolites, Ca and P concentrations and liver enzymes in pre- and post-partum

Item	Treatments ¹		SEM	P-value
	P-DCAD	N-DCAD		
Prepartum				
Blood pH	7.64 ^a	7.43 ^b	0.05	0.02
Glucose, mg/dl	57.5	56.4	4.91	0.88
NEFA, mmol/l	1.86	1.21	0.26	0.15
BHB, mmol/l	0.77	0.56	0.10	0.26
Total protein, mg/dl	6.57	6.46	0.21	0.78
Albumin, mg/dl	4.43	4.14	0.30	0.55
Triglyceride, mg/dl	24.0	23.12	3.96	0.89
Cholesterol, mg/dl	116.8	114.2	13.9	0.90
Ca, mg/dl	9.75	10.70	0.45	0.21
P, mg/dl	6.37	5.64	0.52	0.41
AST, IU/l	111.4	102.2	3.10	0.12
ALT, IU/l	25.45	23.52	2.52	0.75
Immunoglobulin G, mg/ml	22.93	27.18	2.15	0.23
Postpartum				
Blood pH	7.47	7.31	0.06	0.17
Glucose, mg/dl	52.0	47.6	3.08	0.38
NEFA, mmol/l	1.95	1.77	0.14	0.42
BHB, mmol/l	0.83	0.58	0.06	0.08
Total protein, mg/dl	7.23	6.67	0.29	0.22
Albumin, mg/dl	4.46	4.40	0.56	0.93
Triglyceride, mg/dl	27.80	24.40	2.64	0.42
Cholesterol, mg/dl	0.96	94.5	7.92	0.89
Ca, mg/dl	8.16 ^b	9.22 ^a	0.33	0.05
P, mg/dl	4.66	4.26	0.57	0.67
AST, IU/l	78.38	83.72	6.60	0.72
ALT, IU/l	22.85	21.84	3.96	0.87
Immunoglobulin G, mg/ml	19.08	22.60	1.18	0.07

1. Treatments were; P-DCAD; positive dietary cation-anion difference equal to + 165 meq/kg DM; N-DCA: negative dietary cation-anion difference equal to -85 meq/kg DM.

های آزمایشی قرار گرفت ($P < 0.05$). ولی سایر موارد تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. ایمنوگلوبولین‌های آغوز شامل ایمنوگلوبولین‌های M، A و G می‌باشد و بخش اعظم ایمنوگلوبولین آغوز، IgG است. عمده‌ترین ایمنوگلوبولین موجود در آغوز IgG1 می‌باشد که از سرم مادر منشأ می‌گیرد (Sasaki *et al.*, 1976; Barrington *et al.*, 1997). با توجه به این که IgG1 عمده‌ترین ایمنوگلوبولین است و می‌تواند نقش بسیار

در هر حال به‌نظر می‌رسد براساس تغییرات ایجادشده در رابطه با سطح انرژی، سطح کلسیم خون و همچنین سیستم ایمنی دام‌ها استفاده از مکمل‌های آنیونیک تأثیر خفیفی بر بهبود زمان خروج جفت بعد زایش داشته است. سطح تولید آغوز و همچنین سطح ایمنوگلوبولین‌های موجود در آغوز (ایمنوگلوبولین M، A، G) در جدول ۴ ارائه گردیده است. نتایج نشان داد که ایمنوگلوبولین G آغوز تحت تأثیر جیره-

(جدول ۵). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، سطح کلسیم افت قابل توجهی را در دو گروه آزمایشی نداشته است به‌نظر می‌رسد این فرضیه وجود دارد که تلیسه‌ها نسبت به گاوهای چند شکم زایش، کمتر مستعد هیپوکلسیمی تحت بالینی هستند زیرا که آنها دارای فعالیت بیشتر ذخیره‌سازی و تخلیه استخوانی برای آزادسازی کلسیم از ذخایر استخوانی می‌باشند (Van Mosel *et al.*, 1993) و همچنین دوره قبل شیردهی نیز نداشته‌اند که خروجی کلسیم از طریق شیر آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد.

بررسی سطح ایمنوگلوبین خون در دام‌های آزمایشی در پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از نمک‌های آنیونی سبب تأثیر خفیف ($P=0/07$) بر افزایش ایمنوگلوبین G در خون تلیسه‌ها گردید (جدول ۵). هم‌راستا با این یافته، افزایش ایمنوگلوبین G در آغوز تلیسه‌های مصرف‌کننده مکمل آنیونیک نیز در این آزمایش مشاهده گردیده است (جدول ۴). ممکن است سیستم ایمنی گاوها در حول و حوش زایش تضعیف گردد. علت اصلی سرکوب سیستم ایمنی گاوهای انتظار زایمان دقیقاً مشخص نیست ولی با توجه به گزارش‌های پیشین، علی از قبیل تعادل منفی انرژی و پروتئین (Goff, 2008)، تنش‌های محیطی و تغذیه‌ای، عدم تأمین کافی پروتئین قابل متابولیسم، شروع ناگهانی سنتز شیر و کاهش سطح کلسیم خون (Goff & Horst, 1997)، کاهش منابع کلسیم داخل سلولی^۱ و سلول‌های تک‌هسته‌ای محیطی خون (PBMC)^۲، در زمان قبل از زایش می‌توانند موجب کاهش عملکرد سیستم ایمنی بدن گاوها شود. همچنین مشاهده گردیده است که حتی در صورت عدم وقوع هیپوکلسیمی، با برداشتن مصنوعی غده پستانی گاو^۳ زایش کرده، سیستم ایمنی و تولید شیر سرکوب شده است (Goff & Kimura, 2002; Nonnecke *et al.*, 2003). از طرفی بهبود وضعیت ایمنی در خون و به ویژه آغوز تلیسه‌هایی که مکمل آنیونی مصرف کرده اند ممکن است مرتبط با

مهمی در سیستم ایمنی گوساله ایفا کند. نتایج این مطالعه نشان داد که، تغذیه تلیسه‌های انتظار زایمان با اختلاف کاتیون- آنیون منفی می‌تواند باعث تقویت سیستم ایمنی گوساله‌ها از طریق آغوز مادرشان گردد. بهبود وضعیت ایمنوگلوبولین G در خون تلیسه‌هایی که جیره با DCAD منفی دریافت کرده بودند نیز مشاهده گردید (جدول ۵). در حقیقت سطح بالاتر ایمنوگلوبولین G در خون این تلیسه‌ها سبب افزایش غلظت در آغوز نیز گردیده است.

متابولیت‌های خونی و آنزیم‌های کبد

در مطالعه حاضر سطح pH خون در قبل از زایش در تلیسه‌هایی که سطح DCAD منفی دریافت کرده بودند، به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P<0/05$). کاهش pH خون در زمان قبل زایش در تلیسه‌هایی دریافت‌کننده مکمل آنیونیک همسو با نتایج Wu *et al.* (2008) و Charbonneau *et al.* (2006) بود که نشان‌دهنده ایجاد اسیدیته ملایم در خون دام‌ها می‌باشد. با توجه به خاصیت آنیونی گوگرد و کلر افت pH خون طبیعی بود. در مطالعه حاضر زمانی بیشتر متابولیت‌های خونی تحت تأثیر DCAD مثبت یا منفی جیره قرار نگرفت. در پیش از زایش هیچ کدام از متابولیت‌های خون و یا حتی آنزیم‌های کبدی تحت تأثیر تغییر DCAD قرار نگرفتند. در بعد زایش بتا‌هیدروکسی بوتیرات در خون تلیسه‌هایی که جیره با DCAD منفی دریافت کرده بودند تمایل به کاهش داشت ($P=0/08$). با توجه به عدم تغییر مصرف خوراک و همچنین عدم تغییر امتیاز وضعیت بدنی (به جهت آزاد شدن ذخایر چربی و تولید اجسام کتون) تحلیل مربوط به تمایل به معنی‌داری بتا‌هیدروکسی بوتیرات نیاز به پژوهش بیشتری خواهد داشت. سطح آنزیم‌های کبدی در خون تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت. با توجه به این‌که دامنه داده‌های مربوط به آنزیم‌های کبدی در دامنه دام سالم می‌باشد (Cebra *et al.*, 1997) به‌نظر می‌رسد این سطح از DCAD مثبت و منفی تأثیری بر فعالیت کبد در این دوره نداشته است.

نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که غلظت کلسیم پلاسمای خون بعد از زایش در تیماری که مکمل آنیونیک مصرف کرده بودند بیشتر بود ($P=0/05$)

1. Intracellular calcium stores
2. Peripheral blood mononuclear cells
3. Mastectomy

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کاهش اختلاف کاتیون- آنیون جیره تلیسه‌های انتظار زایش تا ۸۵- میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم ماده خشک اثری بر مصرف ماده خشک، تولید و ترکیبات شیر نداشت. از طرف دیگر DCAD منفی سبب بهبود وضعیت کلسیم خون شده که به نظر می‌رسد همین عامل سبب تسریع نسبی در زمان خروج جفت در این دام‌ها و تا حدی نیز سبب بهبود ایمنی و افزایش ایمونوگلوبولین G در خون و آغوز شده باشد. با توجه به نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر استفاده از مکمل‌های آنیونیک در دوره انتظار زایش تلیسه‌های آبستن از نظر عملکرد تولیدی بعد زایش قابل توصیه نمی‌باشد اما به نظر می‌رسد استفاده از این مکمل‌ها در شرایط پرورش پرتنش تلیسه‌ها در پیش از زایش قابلیت بهبود سیستم ایمنی را داشته باشد که نیازمند پژوهش بیشتری در این زمینه است.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک به جهت حمایت مالی پژوهش حاضر، تشکر و قدردانی می‌گردد. مقاله منتشر شده حاصل از نتایج به دست آمده در پایان نامه مربوط به نفر اول می‌باشد.

افزایش کلسیم خون این دام‌ها نسبت به تلیسه‌هایی باشد که سطح DCAD مثبت را دریافت کرده بودند. فرضیه ساز و کار تأثیر سطح کلسیم بر سیستم ایمنی در مطالعات پیشین طرح شده است. کلسیم یونیزه داخل سلولی به‌عنوان پیام‌بر ثانویه در انتقال سیگنال‌های سلولی نقش ایفا می‌کند و باعث فعال‌سازی سلول‌های ایمنی می‌شوند (Grafton & Thwaite, 2001). از طرفی (Kimura et al., 2006) گزارش کردند که تقاضای زیاد کلسیم در حول و حوش زایش سبب تأثیر منفی بر اندوخته کلسیم سلول‌های دخیل در ایمنی می‌شوند و همچنین کاهش کلسیم سبب پاسخ ضعیف‌تر سیستم ایمنی خواهد شد که این موضوع در یافته‌های دیگران نیز مورد تأیید قرار گرفته است (Nelson et al., 2010; Martinez et al., 2012). بنابراین به نظر می‌رسد علی‌رغم این که افت کلسیم خون در تلیسه‌هایی که جیره با DCAD مثبت دریافت کرده‌اند مشهود نبود، اما افزایش بیشتر سطح کلسیم در خون تلیسه‌هایی که جیره با DCAD منفی را دریافت کرده بودند پتانسیل افزایش سطح ایمنی در این دام‌ها را داشته است. علاوه بر کلسیم، نقش عوامل دیگر در بهبود وضعیت سیستم ایمنی در خون و آغوز تلیسه‌هایی که جیره با DCAD منفی دریافت کرده‌اند نیاز به پژوهش بیشتری خواهد داشت.

REFERENCES

1. Barrington, G.M., Besser, T.E. & Davis, W.C. (1997). Expression of immunoglobulin G1 receptors in bovine mammary epithelial cells and mammary leukocytes. *Journal of Dairy Science*, 80, 86-93.
2. Block, E. (1984). Manipulating dietary anions and cations for parturient dairy cows to reduce incidence of milk fever. *Journal of Dairy Science*, 67, 2939-2948.
3. Cebra, C.K., Gerry, F.B., Getzy, D.M. & Fettman, M.J. (1997) Hepatic lipidosis in anorectic lactating Holstein cattle. A retrospective study of serum biochemical abnormalities. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 4, 231-237.
4. Charbonneau, E., Pellerin, D. & Oetzel, G.R. (2006). Impact of lowering dietary cation-anion difference in non-lactating dairy cows; a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 89, 537-548.
5. DeGroot, M.A., Block, E. & French, P.D. (2010). Effect of parturient anionic supplementation on periparturient feed intake, health, and milk production. *Journal of Dairy Science*, 93, 5268-5279.
6. Dhiman, T.R. & Sasidharan, V. (1999). Effectiveness of calcium chloride in increasing blood calcium concentrations of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 77, 1597-1605.
7. Ender, F., Dishington, I.W. & Helgebostad, A. (1971). Calcium balance studies in dairy cows under experimental induction and prevention of hypocalcaemia paresis puerperalis. *Zeitschrift Tierphysiologie Tierernahrung, Futtermittelkunde*, 28, 233-256.
8. Ferguson, J. D., Galligan, D.T. & Thomsen, N. (1994). Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 77, 2695-2703.
9. Fredeen, A.H., DePeters, E.J. & Baldwin, R.L. (1988). Characterization of acid-base disturbances and effects on calcium of dietary fixed ions in pregnant or lactating does. *Journal of Animal Science*, 66, 159-173.

10. Giulio, C., Francesca, D.C., Pesavento, A., Ravarotto, L. & Gianfranco, G. (2005). Effects of two different prepartum diets on some metabolic traits and productive response in multiparous Holstein cows in early lactation. *Italian Journal of Dairy Science*, 4, 127-130.
11. Goff, J.P. & Horst, R.L. (1998). Use of hydrochloric acid as a source of anions for prevention of milk fever. *Journal of Dairy Science*, 81, 2874-2880.
12. Goff, J.P. (2008a). Transition Cow Immune Function and Interaction with Metabolic Diseases. *Tri-State Dairy Nutrition Conference*, pp: 45-57.
13. Goff, J.P. & Horst, R.L. (1997). Physiology and management; physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science*, 80, 1260-268.
14. Goff, J.P. & Kimura, K. (2002). Effect of mastectomy on milk fever, energy, and vitamins A, E, and β -carotene status at parturition. *Journal of Dairy Science*, 85, 1427-1436.
15. Grafton, G. & Thwaite, L. (2001). Calcium channels in lymphocytes. *Immunology*, 104, 119-126.
16. Grummer, R.R., Mashek, D.G. & Hayirli, A. (2004). Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Veterinary Clinics North American Food Animal Practice*, 20, 447-70.
17. Horst, R.L., Goff, J.P., Reinhardt, T.A. & Boxtton, D.R. (1997). Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 80, 1269-1280.
18. Jones, G. (2008). Pharmacokinetics of Vitamin D toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88(Suppl), 582S-586S.
19. Joyce, P.W., Sanchez, W.K. & Goff, J. P. (1997). Effect of anionic salts in prepartum diets based on alfalfa. *Journal of Dairy Science*, 80, 2866-2875.
20. Kimura, K., Reinhardt, T.A. & Goff, J.P. (2006). Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 89, 2588-2595.
21. Martinez, N., Risco, C.A., Lima, F.S., Bisinotto, R.S., Greco, L.F., Ribeiro, E.S., Maunsell, F., Galvao, K.N. & Santos, J.E.P. (2012). Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *Journal of Dairy Science*, 95, 7158-7152.
22. Melendez, P., Donovan, G.A., Risco, C.A., Littell, R. & Goff, J.P. (2003). Effect of calcium-energy supplement on calving-related disorders, fertility and milk yield during the transition period in cows fed anionic diets. *Theriogenology*, 60, 843-854.
23. Moore, S.J., Vandehaar, M.J., Sharma, K., Pilbeam, T.F., Beede, D.K., Bucholtz, F., Liesman, J.S., Horst, R.L. & Goff, J.P. (2000). Effect of altering dietary cation-anion difference on calcium and energy metabolism in prepartum cows. *Journal of Dairy Science*, 83, 2095-2099.
24. Muller, L.D. & Ellinger, D.K. (1981). Colostral immunoglobulin concentrations among breeds of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 64, 1727-1730.
25. National Research Council. (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7th revised edition. National Academy Press, Washington, DC, USA.
26. Nelson, C.D., Reinhardt, T.A., Thacker, T.C., Beitz, D.C. & Lippolis, J.D. (2010). Modulation of the bovine innate immune response by production of $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D₃ in bovine monocytes. *Journal of Dairy Science*, 93, 1041-1049.
27. Nonnecke, B.J., Kimura, K., Goff, J.P., Marcus, J. & Kehrl, E. (2003). Effects of the mammary gland on functional capacities of blood mononuclear leukocyte populations from periparturient cows. *Journal of Dairy Science*, 86, 2359-2368.
28. Oetzel, G.R. & Barmore, J.A. (1993). Intake of a concentrate mixture containing various anionic salts fed to pregnant, nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 76, 1617-1623.
29. Sanchez, W. K. (2003). The latest in dietary cation-anion difference (DCAD) Nutrition. In: *Proceeding of 43rd Annual Dairy Cattle Day* 26th March., Main Theater. University of California. Davis Campus.
30. Sasaki, M., Davis, C.L. & Larson, B.L. (1976). Production and turnover of IgG1 and IgG2 immunoglobulin in the bovine around parturition. *Journal of Dairy Science*, 59, 2046-2055.
31. Tucker, W., Xin, Z. & Hemkin, R.W. (1991). Influence of calcium chloride on systemic acid-base status and calcium metabolism in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 74, 1401-1407.
32. Tucker, W.B., Xin, Z. & Hemkin, R.W. (1988). Influence of dietary calcium chloride on adaptive changes in acid-base status and mineral metabolism in lactating dairy cows fed a diet high in sodium bicarbonate. *Journal of Dairy Science*, 71, 1587-1597.
33. Van Mosel, M., Van't Klooster, A.T., van Mosel, F. & Kuilen, J.V.D. (1993). Effects of reducing dietary $[(Na + K) - (Cl + SO_4)]$ on the rate of calcium mobilization by dairy cows at parturition. *Research in Veterinary Science*, 54, 1-9.
34. Wu, W.X., Liu, J.X., Xu, G.Z. & Ye, J.A. (2008). Calcium homeostasis, acid-base balance, and health status in preparturient Holstein cows fed diets with low cation-anion difference. *Livestock Science*, 117, 7-14.