

**AHOH-163** Rev. Cientif. FCV-LUZ, XXXIII, SE, 221-222, 2023, <https://doi.org/10.52973/rcfcv-wbc081>

## Characterization of cellular immune system at different ages in water buffalo (*Bubalus bubalis*)

**Maria C. Scata<sup>1\*</sup>, Giovanna De Matteis<sup>1</sup>,  
Francesco Grandoni<sup>1</sup>, Gabriele Di Vuolo<sup>2</sup>,  
Giovanna Cappelli<sup>2</sup>, Domenico Vecchio<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> CREA-Council for Agricultural Research and Economics,  
Research Centre for Animal Production and Aquaculture,  
Monterotondo, Italy

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno,  
CReNBuF Portici, Italy

\*Corresponding author: Maria Carmela Scata  
([mariacarmela.scata@crea.gov.it](mailto:mariacarmela.scata@crea.gov.it)).

### ABSTRACT

The immune system is part of a regulatory network linking physiology, pathophysiology and behavior and it can be regarded as a source of biomarkers for monitoring health and animal welfare. In recent years, there was an increased interest in understanding the immune system of water buffalo due to the growing economic impact of this species. In Italy, buffalo farming constitutes an important livestock resource to produce typical mozzarella cheese. In this study, to characterize the myeloid and lymphoid cells in peripheral blood of buffalo, we assessed three flow cytometric multicolor panels of antibodies: panel 1, with anti CD3, CD4, CD8 $\alpha$  and TCR- $\delta$  mAbs; panel 2, with anti CD79a and CD21 mAbs; panel 3 with anti CD172a, CD14, CD16, CD335 mAbs. Seventy-eight animals from three farms were divided into 3 groups by age: 80-100 day old calves (N=26); 16-18 months old heifers (N=26) and 3-6 year old cows in dry status (N=26). Heparinized blood samples were labelled with each antibody cocktail and collected on a CytoFLEX flow cytometer. Significant differences were found by Mann-Whitney test between adult and heifer groups in the mean value of percentage of granulocytes (19.5 vs 13.2;  $p=0.0158$ ), PBMC (76.3 vs 84.6;  $p=0.0015$ ), total monocytes (6.8 vs 4.3), T helper (55.6 vs 33.3), T cytotoxic (33.1 vs 54.3),  $\gamma\delta$  lymphocytes (13.3 vs 32.7) with  $p<0.0001$ , and NK cells (5.4 vs 3.5;  $p=0.0109$ ) and between adult and calf groups in total monocytes (6.8 vs 4.5;  $p=0.0123$ ), T helper (55.6 vs 27.9), T cytotoxic (33.1 vs 56.1),  $\gamma\delta$  lymphocytes (13.3 vs 40.4), ( $p<0.0001$ ), and NK cells (5.4 vs 7.0;  $p=0.0112$ ). Significant differences between heifer and calf groups were found only in  $\gamma\delta$  lymphocytes (32.7 vs 40.4), ( $p=0.0002$ ), and NK cells (3.5 vs 7.0;  $p<0.0001$ ). Furthermore, the Kruskal-Wallis test highlighted statistical differences in the adult group between the farms in the mean value of percentage of granulocytes ( $p=0.0030$ ), PBMC ( $p=0.0120$ ), total ( $p=0.0152$ ), helper ( $p=0.0047$ ), cytotoxic ( $p=0.0019$ ) and  $\gamma\delta$  T lymphocytes ( $p=0.0013$ ); total monocytes ( $p=0.0100$ ), cM and ncM subsets ( $p=0.0320$ ;  $p=0.0252$ ); CD21<sup>+</sup> B lymphocytes ( $p=0.0007$ ). The calves showed differences in total monocytes

Caracterización del sistema inmunológico celular a diferentes edades en búfalo de agua (*Bubalus bubalis*)

**Maria C. Scata<sup>1\*</sup>, Giovanna De Matteis<sup>1</sup>,  
Francesco Grandoni<sup>1</sup>, Gabriele Di Vuolo<sup>2</sup>,  
Giovanna Cappelli<sup>2</sup>, Domenico Vecchio<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> CREA-Consejo de Investigación y Economía Agrícola,  
Centro de Investigación sobre Producción Animal y  
Acuicultura, Monterotondo, Italia

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno,  
CReNBuF Portici, Italia

\*Corresponding author: Maria Carmela Scata  
([mariacarmela.scata@crea.gov.it](mailto:mariacarmela.scata@crea.gov.it)).

### RESUMEN

El sistema inmunológico forma parte de una red reguladora que vincula la fisiología, la fisiopatología y el comportamiento y puede considerarse como una fuente de biomarcadores para controlar la salud y el bienestar animal. En los últimos años ha habido un mayor interés en comprender el sistema inmunológico del búfalo de agua debido al creciente impacto económico de esta especie. En Italia, la cría de búfalos constituye un importante recurso ganadero para producir el típico queso mozzarella. En este estudio, para caracterizar las células mieloides y linfoides en sangre periférica de búfalo, evaluamos tres paneles multicolores de anticuerpos por citometría de flujo: panel 1, con mAb anti CD3, CD4, CD8 $\alpha$  y TCR- $\delta$ ; panel 2, con mAb anti CD79a y CD21; panel 3 con mAb anti CD172a, CD14, CD16, CD335. Setenta y ocho animales de tres granjas se dividieron en 3 grupos por edad: terneros de 80 a 100 días (N=26); novillas de 16 a 18 meses (N=26) y vacas de 3 a 6 años en estado seco (N=26). Se etiquetaron muestras de sangre heparinizada con cada cóctel de anticuerpos y se recogieron en un citómetro de flujo CytoFLEX. Se encontraron diferencias significativas mediante la prueba de Mann-Whitney entre los grupos de adultos y novillas en el valor medio del porcentaje de granulocitos (19,5 vs 13,2;  $p=0,0158$ ), PBMC (76,3 vs 84,6;  $p=0,0015$ ), monocitos totales (6,8 vs 4,3), células T auxiliares (55,6 frente a 33,3), T citotóxica (33,1 frente a 54,3), linfocitos  $\gamma\delta$  (13,3 frente a 32,7) con  $p<0,0001$  y células NK (5,4 frente a 3,5;  $p=0,0109$ ) y entre grupos de adultos y terneros en monocitos totales (6,8 frente a 4,5;  $p=0,0123$ ), T auxiliares (55,6 frente a 27,9), T citotóxica (33,1 frente a 56,1), linfocitos  $\gamma\delta$  (13,3 frente a 40,4), ( $p<0,0001$ ) y células NK (5,4 frente a 7,0;  $p=0,0112$ ). Se encontraron diferencias significativas entre los grupos de novillas y terneros sólo en los linfocitos  $\gamma\delta$  (32,7 frente a 40,4), ( $p=0,0002$ ) y las células NK (3,5 frente a 7,0;  $p<0,0001$ ). Además, la prueba de Kruskal-Wallis destacó diferencias estadísticas en el grupo de adultos entre las granjas en el valor medio del porcentaje de granulocitos ( $p=0,0030$ ),

( $p=0.0010$ ), cM and ncM subsets ( $p=0.0335$  and  $p=0.0065$ ), respectively. The heifers showed differences only in the CD21<sup>+</sup> B lymphocyte subset ( $p=0.0439$ ). In summary, this study provides, for the first time, the composition of myeloid and lymphoid cells in this species highlighting large differences between calves, young and adult buffaloes and between different herds. Our results provide a resource for the further study of the immune system and to monitor health and welfare at animal and farm level.

**Keywords:** buffalo, immune system, age, flow cytometry.

**Acknowledgements.** The study was funded by Project IZS ME 08/18 RC-Study of animal welfare and sustainability of the dairy buffalo production chain using a multidisciplinary approach.

PBMC ( $p=0.0120$ ), total ( $p=0.0152$ ), auxiliar ( $p=0.0047$ ), citotóxicos ( $p=0.0019$ ) y linfocitos T  $\gamma\delta$  ( $p=0.0013$ ); monocitos totales ( $p=0.0100$ ), subconjuntos cM y ncM ( $p=0.0320$ ;  $p=0.0252$ ); linfocitos B CD21<sup>+</sup> ( $p=0.0007$ ). Los terneros mostraron diferencias en monocitos totales ( $p=0.0010$ ), subconjuntos de cM y ncM ( $p=0.0335$  y  $p=0.0065$ ), respectivamente. Las novillas mostraron diferencias sólo en el subconjunto de linfocitos B CD21<sup>+</sup> ( $p=0.0439$ ). En resumen, este estudio proporciona, por primera vez, la composición de las células mieloides y linfoides en esta especie, destacando grandes diferencias entre crías, búfalos jóvenes y adultos y entre diferentes rebaños. Nuestros resultados proporcionan un recurso para seguir estudiando el sistema inmunológico y para monitorear la salud y el bienestar a nivel animal y de granja.

**Palabras clave:** búfalo, sistema inmunológico, edad, citometría de flujo.

**Agradecimientos.** El estudio fue financiado por el Proyecto IZS ME 08/18 RC-Estudio de bienestar animal y sostenibilidad de la cadena productiva de la búfala lechera mediante un enfoque multidisciplinario.