



FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA DI PISA

SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN:

“SANITA' ANIMALE, ALLEVAMENTO E PRODUZIONI ZOOTECNICHE”

Direttore: prof. Domenico Cerri

TESI

DIAGNOSI DELLE MASTITI BOVINE:

METODI CLINICO-FISICI A CONFRONTO

CANDIDATO: dott. Alberto Sbrana

RELATORE: Prof. Domenico Cerri

CORRELATORE: Dott. Filippo Fratini

aa. 2011/2012

INDICE

RIASSUNTO	p.3
PARTE GENERALE	
INTRODUZIONE	p. 5
LA PATOLOGIA MAMMARIA	p. 6
MASTITI BOVINE	p. 6
DIAGNOSI DELLE MASTITI BOVINE	p. 10
ESAME CLINICO DELLA MAMMELLA	p. 10
ANALISI DEL LATTE	p. 11
CALIFORNIA MASTITIS TEST	p. 12
CONDUCIBILITÀ ELETTRICA	p. 12
pH	p. 13
CONTA CELLULE SOMATICHE	p. 14
ESAME MICROBIOLOGICO	p. 14
PARTE SPERIMENTALE	
MATERIALI e METODI	p. 16
RISULTATI	p. 24
DISCUSSIONE e CONCLUSIONI	p. 31
BIBLIOGRAFIA	p.33

RIASSUNTO

Nel nostro paese l'allevamento bovino da latte negli ultimi decenni ha subito notevoli trasformazioni, sia da un punto di vista numerico che gestionale. Si è assistito alla riduzione del numero di allevamenti associata all'aumento di animali per singolo allevamento al fine di incrementare le performance degli animali ed aumentare quindi la produttività dell'azienda. A fronte dei sensibili miglioramenti produttivi ha fatto riscontro però un peggioramento dei parametri riproduttivi. Le patologie mammarie di natura infettiva sono da sempre uno dei principali problemi dell'allevamento bovino da latte e nonostante siano ormai decenni che vengono studiate e combattute, a causa della continua evoluzione delle tecniche di allevamento della notevole capacità di adattamento alle nuove situazioni epidemiologiche degli agenti patogeni, i risultati non sono confortanti con conseguenti danni economici per gli allevamenti. La possibilità di eseguire una diagnosi precoce di mastite, anche nelle forme più subdole, attraverso metodi semplici e da fare in loco risulta quindi estremamente importante. Nel presente studio sono stati messi a confronto vari tests diagnostici quali il California Mastitis Test (CMT), la Conducibilità Elettrica (CE), il pH, la Conta delle Cellule Somatiche e l'esame su un campione di 54 bovine in lattazione di un allevamento intensivo. I test sono stati eseguiti sui campioni di latte proveniente da ciascun quarto ed è stata valutata la correlazione tra il test di Conta delle Cellule Somatiche vs CMT, pH e CE. I risultati ottenuti dai vari test hanno evidenziato che non esiste correlazione statisticamente significativa.

ABSTRACT

In our country the breeding dairy cattle in recent decades has undergone considerable change, both from a numerical point of view that management. There has been a reduction in the number of farms associated with an increase of animals per farm in order to increase the performance of the animals and thus increase productivity. In view of the sensitive improvements in production has been accompanied, however, a worsening of reproductive parameters. The breast disease of an infectious nature have always been one of the main problems of cattle breeding and dairy despite decades now, are studied and combated, due to the continuous development of breeding techniques of the remarkable ability to adapt to new situations epidemiological agents pathogens, the results are encouraging, resulting in economic losses to livestock. The ability to perform an early diagnosis of mastitis, even in more subtle forms through simple methods to do on site and is therefore extremely important. In the present study were compared various diagnostic tests such as the California Mastitis Test (CMT), electrical conductivity (EC), pH, Counting of Somatic Cells and examination of a sample of 54 lactating cows in a herd intensive. The tests were performed on the samples of milk from each quarter and has been evaluated the correlation between the test of somatic cell count vs. CMT, pH and EC. The results obtained from the various tests have shown that there is no statistically significant correlation.

PARTE GENERALE

INTRODUZIONE

Nel nostro paese l'allevamento bovino da latte negli ultimi decenni ha subito notevoli trasformazioni, sia da un punto di vista numerico che gestionale.

Attualmente in Italia sono presenti circa 1750000 bovini da latte con una media per allevamento di circa 95 capi e una produzione media per lattazione, nella razza frisona italiana, di 9190 kg (dati AIA, 2012). Negli ultimi anni il sistema produttivo italiano dell'allevamento della vacca da latte si è prevalentemente indirizzato verso la diminuzione del numero degli allevamenti aumentando la consistenza dei capi per allevamento e ad incrementare le performance degli animali allo scopo di elevare il più possibile la quantità di latte complessivamente prodotta per azienda. Questi obiettivi sono stati perseguiti al fine di contenere soprattutto i costi fissi poiché rappresentano, parimenti alla dipendenza dal mercato per l'acquisto degli alimenti, la voce passiva di bilancio più rilevante e non permettono alle aziende di essere adeguatamente competitive con il mercato europeo. Si è assistito pertanto in Italia a un intenso processo di spinta produttiva degli animali, che ha comportato, negli ultimi 40 anni, il quasi raddoppio della produzione media di latte per capo, per quanto riguarda sia le bovine di razza Frisona sia quelle di razza Bruna. A fronte di questi sensibili miglioramenti produttivi ha fatto riscontro però, dal 1970 ad oggi, un peggioramento dei parametri riproduttivi, con un sensibile allungamento del periodo parto-concepimento, l'innalzamento del tasso di sostituzione e la riduzione del numero medio di lattazioni per vacca dovuto oltre che alle patologie metaboliche ed infettive anche alla maggiore vulnerabilità degli animali agli stress ambientali.

La Patologia Mammaria

Dalla salute della mammella dipendono: il benessere delle bovine, la qualità igienico-sanitaria e casearia del latte e la redditività dell'allevamento.

Le patologie mammarie di natura infettiva sono da sempre uno dei principali problemi che affliggono l'allevamento bovino da latte.

Nonostante siano ormai decenni che questa patologia viene studiata e combattuta, proprio per questa continua evoluzione delle tecniche di allevamento e per la notevole capacità di adattamento alle nuove situazioni epidemiologiche degli agenti patogeni, i risultati non sono confortanti. Infatti, ancor oggi risulta che una bovina su due denuncia problemi mammari, mentre la percentuale del numero di animali riformati per questo problema è circa del 6-7% (Dati AIA, 2012; ANAFI 2012) situazione analoga riscontrata negli anni 90 (Ballarini, 1994).

Attualmente, il danno economico determinato dalle patologie mammarie negli allevamenti è superiore in proporzione a quello del secolo scorso ,in quanto oltre al danno determinato dalla riduzione quantitativa del latte, il costo della terapia e della manodopera, va aggiunto il danno determinato dalla produzione di latte con parametri organolettici non conformi alle normative europee che regolamentano la produzione ed il commercio del latte che quindi non può essere commercializzato.

Mastiti Bovine

Le **mastiti** sono le patologie più frequenti nell'allevamento della bovina da latte in tutto il mondo e determinano ingenti perdite economiche dirette (al calo delle produzioni, alla riforma degli animali scarsamente produttivi) ed indirette (spese veterinarie, problemi alla caseificazione, manodopera, diminuzione del valore del latte per la qualità). Da dati pubblicati nel 2006 tali perdite rappresentano un costo per l'allevamento di 50-350 Euro/Capo/Anno e ciascuna infezione può costare all'allevatore, per interventi veterinari e farmaci, circa 200 Euro.

La mastite bovina è per definizione, un'inflammatione a carico della ghiandola mammaria causata, nella maggior parte dei casi, da infezioni imputate ad agenti patogeni di natura batterica (Menzies et al., 2001).

In questa patologia di natura infettiva possono essere coinvolti diversi microrganismi ed è fortemente condizionata da fattori ambientali, gestionali ed igienici d'allevamento (Amadori M

2005) Gli organismi che possono causare mastite sono diversi, raramente virus, lieviti e funghi, mentre sono molto frequenti batteri e micoplasmi. Si tratta comunque di organismi che sono presenti sull'animale e nell'ambiente, capaci di penetrare attraverso il capezzolo nella ghiandola mammaria e di riprodursi danneggiando il tessuto mammario, modificando le caratteristiche del latte e nei casi più gravi, determinando forme generalizzate che possono portare anche a morte l'animale (Caroline Viguier et al. 2009).

Dal punto di vista patogenetico le mastiti si dividono in **ascendenti** e **discendenti**.

Le prime, dal punto di vista della casistica più rappresentative, derivano dalla capacità dei batteri patogeni di forzare lo sfintere del capezzolo e penetrare nel parenchima mammario.

Quest'attitudine può essere agevolata da fattori predisponenti, come:

- fattori igienici scadenti quali lettiera sporca, scarsa o assente pulizia delle cuccette, insufficiente pulizia dei corridoi;
- fattori legati a cattiva gestione dell'impianto di mungitura, quali errori riguardanti il vuoto della mungitrice automatica, errori nelle procedure di mungitura, cattiva igiene in sala di mungitura.

Le mastiti discendenti sono causate da batteri patogeni che per via sistemica raggiungono la mammella. In questo caso la patologia mammaria rappresenta un sintomo di una grave infezione batterica sistemica.

In base agli aspetti clinici possono essere suddivise in forme cliniche e forme subcliniche.

La mastite clinica è caratterizzata dalla comparsa dei sintomi clinici come rigonfiamento della mammella, iperemia, perdita di appetito, dolore locale, zoppia, in rari casi anche morte.

Le mastiti cliniche, secondo il decorso della sintomatologia possono a loro volta essere classificate in quattro tipologie:

- 1) mastite clinica subacuta;
- 2) mastite clinica acuta;
- 3) mastite acuta sistemica o iperacuta;
- 4) mastite cronica.

La forma sub-clinica non è caratterizzata da una chiara sintomatologia ed è quindi diagnosticabile solo attraverso esami di laboratorio.

Le mastiti sub-cliniche sono quelle di maggior interesse, poichè sono più difficilmente diagnosticabili e quindi hanno più possibilità di diffondersi nell'allevamento, soprattutto se in presenza di condizioni predisponenti. La loro eradicazione non sempre è possibile, ma il loro contenimento può essere raggiunto con delle efficaci misure profilattiche e con l'uso di antibiotici appropriati.

Infine, in base alle caratteristiche di trasmissione dell'organismo responsabile possono essere classificate in ambientali e contagiose.

Considerando l'eziologia e la modalità di trasmissione, i microrganismi coinvolti possono essere suddivisi in:

1. Batteri contagiosi,
2. Batteri ambientali,
3. Batteri opportunisti,
4. Patogeni mammari non comuni.

I batteri contagiosi hanno uno spiccato tropismo per il tessuto mammario, mentre hanno scarsa capacità di sopravvivere nell'ambiente, quindi si diffondono direttamente da animale malato ad animale sano attraverso il contatto diretto col latte. La principale fonte di contagio di questa categoria di batteri è l'impianto di mungitura e le mani dei mungitori. I principali batteri appartenenti a questa categoria sono:

- *Streptococcus agalactiae*,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Corynebacterium bovis*,
- *Mycoplasma* spp.

I patogeni ambientali sono batteri presenti comunemente nell'ambiente in cui vivono le bovine e penetrano nella mammella nel periodo intercorrente tra le due mungiture, quando i capezzoli vengono in contatto con le deiezioni o la lettiera.

Appartengono a questo gruppo:

- *Streptococcus uberis*,
- *Streptococcus dysgalactiae*,
- altri streptococchi,
- *Escherichia coli*,
- Coliformi,
- *Actinomyces pyogenes*.

I patogeni opportunisti sono batteri che vivono normalmente sull'epidermide degli animali e che possono diventare patogeni in animali soggetti ad abbassamento delle difese immunitarie.

I batteri di questo tipo sono:

- *Staphylococcus epidermidis*,
- *Staphylococcus chromogenes*,
- *Staphylococcus haemolyticus*,
- altri stafilococchi.

Tra i patogeni mammari non comuni si annoverano un gruppo di batteri che solo sporadicamente possono determinare gravi mastiti e in genere interessano solo pochi animali della mandria.

Questi patogeni sono:

- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Actinomyces piogenes*,
- *Nocardia* spp.,
- *Micoplasm*i spp.,
- Lieviti e miceti.

La seconda classificazione divide i microrganismi in patogeni maggiori e in minori.

I primi sono patogeni per la mammella indipendentemente dai fattori esterni e in genere causano danni gravi, mentre i secondi invece necessitano di fattori condizionanti.

Nei patogeni maggiori comprendiamo:

- tutti i contagiosi,
- i coliformi,
- *Actinomyces piogenes*.

Nei patogeni minori sono compresi:

- stafilococchi coagulasi negativi,
- gli streptococchi ambientali.

La prevenzione delle mastiti si basa sull'igiene dell'ambiente, su una corretta pratica di mungitura, sulla **gestione sanitaria dell'asciutta**, sul monitoraggio dello stato sanitario della mammella e sul corretto impiego dei farmaci antimastitici.

Diagnosi delle Mastiti Bovine

Per accrescere produttività e qualità negli allevamenti da latte è importante poter fare diagnosi tempestive di condizioni fisiologiche e patologiche rilevanti ai fini delle *performance* e a tal scopo si rivelano essenziali i sistemi di monitoraggio automatico per il controllo della gestione produttiva, riproduttiva e sanitaria della mandria che vanno diffondendosi sempre di più negli allevamenti di bovine da latte.

La diagnosi di mastite è eseguita sia tramite esame clinico della mammella che l'analisi del latte (K. K. Reyher 2011)

Esame clinico della mammella

Le mastiti cliniche sono facilmente evidenziabili con un esame obiettivo particolare dell'apparato mammario. All'ispezione si possono osservare asimmetrie dei quarti, ingrossamento dei capezzoli e arrossamento della cute (Foto n.1 e n.2) Alla palpazione è possibile apprezzare zone di parenchima

mammario ingrossate, più dure, più calde e in alcuni casi anche doloranti. Questi segni clinici devono comunque essere avvalorati dal controllo visivo del primo latte munto a mano, capezzolo per capezzolo, in quanto in caso di mastite, nella maggior parte dei casi, risulterà alterato sia nella colorazione che nella densità a causa della presenza di coaguli e/o fiocchi di fibrina (Rosenberger 1979)



Foto n.1 Mammella Sana

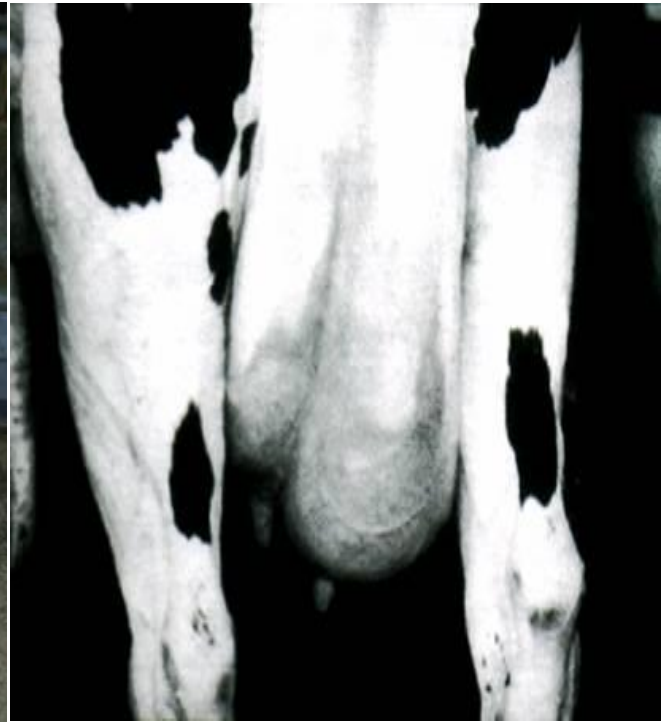


Foto n.2 Mammella Mastitica

La diagnosi della mastite subclinica è più problematica, perché la mammella non presenta alterazioni apprezzabili e il latte secreto sembra apparentemente normale. In tali casi la diagnosi di quarto infetto può essere stilata direttamente tramite il conteggio delle cellule somatiche o indirettamente attraverso il California Mastitis Test (CMT).

Analisi del Latte

L'analisi del latte permette di evidenziare le alterazioni macro e microscopiche e si avvale di vari test che possono essere eseguiti non solo in laboratorio ma anche direttamente in stalla (Barberio et al. 2006)

California Mastitis Test (CMT)

Il CMT è un test di screening semplice, poco costoso e rapido. Si basa sulla valutazione della quantità di materiale nucleare cellulare presente nel campione di latte. Per far questo, 2 cc di latte appena munto viene mescolato con 2 ml di tensioattivo (soluzione costituita da 96 g di Na-Lauril-Solfato /5 lt) che provoca la lisi delle cellule presenti e quindi il rilascio del DNA contenuto nei nuclei. I filamenti di DNA formano un reticolo che intrappolerà i globuli di grasso formando flocculazioni. L'aggiunta di un indicatore di pH colorato (rosso di bromocresolo) al tensioattivo facilita la lettura della reazione. In corso di mastite il contenuto di cellule infiammatorie tende ad aumentare facendo sì che il risultato del CMT è direttamente correlato al contenuto di cellule somatiche e il test rappresenta un valido e sensibile indicatore del grado di infiammazione della mammella.

Interpretazione CMT:

Test negativo: il latte non vira di colore e rimane invariata la sua consistenza. Il test negativo corrisponde a un numero di cellule somatiche inferiore a 200.000 cell/ml.

Positività lieve: il latte presenta tracce di consistenza gelatinosa e aderisce al fondo del pozzetto, inoltre il colore vira leggermente verso il viola. Questo risultato corrisponde ad un numero di cellule somatiche compreso tra 200.000 e 400.000 cell/ml.

Positività evidente: grandi quantità di latte gelatinoso scivola lentamente sul fondo del pozzetto. Questo risultato corrisponde a un numero di cellule somatiche compreso tra 400.000 e 1.200.000 cell/ml.

Positività conclamata: si forma un unico coagulo gelatinoso di colore viola più scuro. Questo risultato corrisponde a un numero di cellule somatiche compreso tra 1.200.000 e 5.000.000 cell/ml.

Conducibilità Elettrica

Il sistema permette di individuare le bovine sofferenti di mastite di tipo subclinico, forme patologiche che non manifestano sintomatologie acute immediate, ma che determinano comunque un forte peggioramento delle caratteristiche qualitative e commerciali del latte, potendo intervenire, nella maggior parte dei casi, prima che si possano generare a livello del parenchima mammario lesioni irreversibili, con conseguente allungamento della carriera delle bovine.

Diversi autori hanno evidenziato una correlazione positiva, ma non molto elevata, tra i valori di CE del latte e i valori di cellule somatiche (CS). Questa correlazione dipende dal fatto che l'aumento del livello di CS dovuto a mastite subclinica permane più a lungo che non l'aumento dei valori di CE del latte. Il parametro CE risulta correlato al numero di cellule somatiche solo per concentrazioni superiori a 400.000 cell/millilitro. L'applicazione di questi sistemi (CE) è però ancora oggetto di ampie discussioni e la loro accuratezza è tuttora messa in dubbio. Più semplice e diretto sarebbe, pertanto, il controllo della qualità del latte, se giornalmente l'allevatore potesse conoscere il valore di SCC del latte prodotto utilizzando strumenti capaci di rilevare direttamente in stalla tale parametro (Molinari et al, 2008).

Il latte mastitico mostra una conducibilità elettrica maggiore rispetto a quello normale. Le alterazioni della permeabilità delle membrane cellulari del tessuto secernente presenti in caso di mastite comportano un rilascio di ioni sodio e cloro nel latte con conseguente alterazione della conducibilità elettrica del latte prodotto.

I sensori della conducibilità elettrica del latte sono incorporati nelle moderne mungitrici automatiche dando un dato giornaliero in tempo reale per tutte le bovine munte. Questo valore tende a variare durante il tempo di mungitura, quindi è buona norma prendere il dato a metà mungitura. Un aumento di questo parametro non è indicativo, ma deve servire al mungitore come indicazione per un controllo più accurato della mammella. I valori di conducibilità elettrica si considerano nella norma se rientrano nell'intervallo $40 \cdot 10^{-4} \text{ Ohm}^{-1}$ e $50 \cdot 10^{-4} \text{ Ohm}^{-1}$ a 25°C .

pH

Si osservano variazioni di pH nel latte di bovine mastitiche. È un'indagine molto semplice che può essere eseguita direttamente in sala di mungitura con delle cartine al tornasole oppure in laboratorio con un pHmetro.

Il pH evidenzia l'acidità "attuale" (stato di freschezza del latte), cioè il contenuto di ioni idrogeno disciolti. Il latte presenta un pH prossimo alla neutralità ed è una soluzione tamponata, cioè per piccole aggiunte di acidi o basi, il pH non varia. Questo perché vi sono funzioni acide o basiche libere che neutralizzano eventuali acidi o basi aggiunti. Tali sostanze sono principalmente le proteine del latte che presentano gruppi ionici con cariche positive o negative in base al pH del latte stesso. Pertanto si possono considerare anormali i latti che presentino piccole variazioni di pH dall'intervallo di riferimento considerato fisiologico, tra 6.6 e 6.8. Esiste una relazione di

proporzione inversa fra il pH e la quantità di proteine presenti, quindi quando il contenuto totale di proteine scende, il pH aumenta. Il colostro ha il pH più basso per il tenore elevato di proteine.

Conteggio delle Cellule Somatiche

Il conteggio delle cellule somatiche nel latte di massa rappresenta una misura della qualità del latte, mentre nel latte prodotto da una singola mammella può dare indicazioni sullo stato di salute della medesima. Un valore inferiore a 200.000 cell/ml è considerato accettabile (Sharma et al, 2011), sebbene il Reg.CE 853/2004 indichi 400.000 cell/ml come cut-off per la sanità del latte.

Questo test è estremamente condizionato dalla modalità di prelievo e mantenimento del campione. Occorre, infatti, tenere presente che le cellule somatiche variano di concentrazione durante il periodo della munta e quindi possono oscillare di numero a seconda del momento del campionamento e che non essendo solubili nel latte tendono a stratificare, pertanto prima del campionamento il latte di massa deve essere opportunamente agitato così come il campione prima dell'analisi. Infine è bene ricordare che esistono delle mastiti causate da patogeni minori come gli stafilococchi coagulasi negativi che non determinano grosse migrazioni di cellule nel parenchima mammario (Barkema et al. 1998)

Esame microbiologico

E' sicuramente l'esame più provante lo stato di mastite, infatti con questo tipo di accertamento si può riuscire a isolare e a tipizzare il tipo di agente patogeno responsabile della patologia.

Di fondamentale importanza è l'accuratezza con cui devono essere prelevati i campioni di latte in allevamento, e la celerità con cui devono essere inviati al laboratorio. Questo per impedire la proliferazione dei batteri già presenti nel latte o la contaminazione del latte con germi ambientali.

I campioni di latte sono diluiti in acqua peptonata (1:10) e seminati piastra contenenti terreno MSA (mannitol salt agar) per 48 ore a 37°C. Le colonie sviluppate sono colorate col metodo Gram e di nuovo seminate su piastre contenenti BP (Baird Parker) e incubate a 37°C per 48 ore, al fine di differenziare gli stafilococchi coagulasi-positivi da quelli coagulasi-negativi.

Le colonie che presumibilmente sono riconducibili a *Staphylococcus* spp. vengono successivamente seminate su piastre contenenti AT (Agar Triptosio) ed incubate per 24 ore a 37°C- Su queste colonie verrà effettuata la prova della Catalasi e successivamente seminate su AS (Agar Sangue).

PARTE SPERIMENTALE

MATERIALI E METODI

La nostra ricerca è stata effettuata nell'allevamento di bovine da latte del Centro interdipartimentale ricerche agro-ambientali dell'Università di Pisa "Enrico Avanzi". Questo è un allevamento di tipo intensivo di circa 60 bovine in lattazione, di razza frisona italiana con una produzione latte media pro-capite giornaliera di circa 30 litri (Foto n.3). L'allevamento riesce a produrre latte che rientra negli standard dell'alta qualità che in parte invia alla centrale del latte Granducato di Firenze e in parte vende direttamente in azienda come latte crudo.



Foto n.3 Allevamento Centro "E.Avanzi"

L'alimentazione è somministrata agli animali nelle corsie di alimentazione tramite un carro miscelatore semovente (Storti, Verona, Italia) sotto forma di *uni-feed*. Le componenti principali dell'alimento sono:

- insilato di mais,
- fieno di erba medica,
- fieno di primo taglio,
- farina di mais,
- farina di orzo,
- nucleo proteico e vitaminico,
- mangime composto pellettato acquistato da mangimifici.

La sala di mungitura è disposta su un'unica fila a "liscia di pesce", le pareti sono totalmente piastrellate e quindi lavabili, i pavimenti sono antiscivolo con delle canalette grigliate per agevolare il deflusso delle deiezioni e dell'acqua di lavaggio. La macchina mungitrice (Tecnozoo impianti srl, Lodi, Italia) è dotata di sistema informatico in grado di riconoscere ciascuna bovina nella posta di

mungitura, segnala eventuali situazioni di estro nella mandria grazie ai trasponder contapassi, quantifica il latte prodotto da ciascuna bovina, registra i tempi di mungitura e calcola la conducibilità elettrica del latte di ciascuna bovina. La mungitrice dispone di un impianto di lavaggio automatico, sia durante i vari momenti della mungitura, sia a fine mungitura per pulire accuratamente tutto l'impianto di transito del latte fino alle cisterne frigorifere. Tramite un'apertura sulla parete esterna della stanza del latte si arriva al dispositivo automatico per la vendita del latte crudo.

Animali

Nella nostra ricerca sono state incluse 54 vacche da latte di razza frisona e di età varia e in diversi stadi di lattazione, comunque sempre a partire da 10 giorni dal parto. Su ogni animale è stato eseguito un esame clinico generale e particolare di apparato cardio-circolatorio, gastro-enterico e respiratorio.

Criteri di esclusione:

- animali affetti da sintomatologia riferibile a patologie di varia natura sono stati esclusi dallo studio;
- soggetti sani dal punto di vista di sintomatologia generale, ma affetti da mastite conclamata, perchè già sottoposti a trattamento antibiotico o perché sottoposti ad una gestione della mungitura tale da non permettere l'esame completo del latte.

Esame clinico mammella in sede di mungitura

Tutte le vacche sono state sottoposte durante la mungitura ad un esame obiettivo particolare dell'apparato mammario: ispezione, palpazione del tessuto e sua valutazione clinica. Sono state annotate modificazioni di consistenza, volume, presenza di dolore e calore.

Campionamento

I campionamenti sono stati eseguiti ogni settimana a gruppi di 15 bovine. La suddivisione della raccolta in gruppi di 15 vacche a scadenza settimanale è stata necessaria per permettere al laboratorio di microbiologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Pisa di effettuare le analisi senza gravare sulla sua organizzazione.

Ogni prelievo di latte è stato raccolto durante la mungitura del pomeriggio, in fase di pre-mungitura.

Prima di raccogliere il campione, la mammella e il capezzolo sono stati lavati con acqua corrente e quindi asciugati accuratamente. Mammella e capezzolo sono stati disinfettati con delle salviette a base di clorexidina.

Durante il prelievo l'operatore ha indossato guanti in lattice monouso al fine di evitare contaminazioni mano-mammella. Sono stati eliminati i primi getti di latte all'interno di un contenitore scuro, al fine di poter evidenziare eventuali presenze di coaguli o flocculi. Inoltre l'eliminazione del primo latte munto esclude dal campionamento il latte contenuto nel dotto papillare che, essendo a contatto con l'ambiente esterno, contiene molti più germi (Foto n.4)



Foto n.4 Fasi del campionamento del latte

Sui campioni di latte sono stati valutati:

1. CMT
2. Conducibilità Elettrica (CE)
3. pH
4. Conta Cellule Somatiche
5. Esame Batteriologico

Raccolta per Cellule Somatiche

Il campionamento è stato eseguito per ogni bovina in un contenitore di plastica inserito nel sistema di prelievo della mungitrice automatica, che permetteva di raccogliere aliquote dei 4 quarti,

provenienti da momenti diversi della mungitura (inizio, metà e fine), per rendere significativo il campione da inviare in laboratorio. Il latte prelevato dal raccogliatore era immesso in provette di plastica sterili con conservante (sodio azide).

Raccolta per CMT e batteriologia

Per ogni bovina sono stati campionati tutti e 4 i quarti, per un totale di 216 quarti analizzati.

California Mastitis Test (CMT)

Nel nostro studio abbiamo utilizzato una confezione da 5 litri di LEUCOCYTIS TEST (SACCO), una paletta di plastica con 4 pozzetti separati e una pipettatrice automatica per dosare il reagente. La procedura è molto semplice e soprattutto s'inserisce nelle normali procedure di mungitura senza indurre complicazioni. Dopo la preparazione della mammella descritta in precedenza, i capezzoli vengono munti disperdendo una prima quantità di latte (dotto galattoforo). Quindi, si raccoglie un campione di latte da ciascun quarto. Ogni campione di latte proveniente da uno specifico quarto è posto in un singolo pozzetto della paletta, quindi a un quarto corrisponde un pozzetto. La corretta inclinazione della paletta permette la quantificazione del latte contenuto che deve essere di 2 ml. A ogni campione di latte sono aggiunti 2 ml di reagente, la miscela è agitata lentamente per circa 10 secondi, tempo necessario per la rilevazione delle variazioni cromatiche e di consistenza.

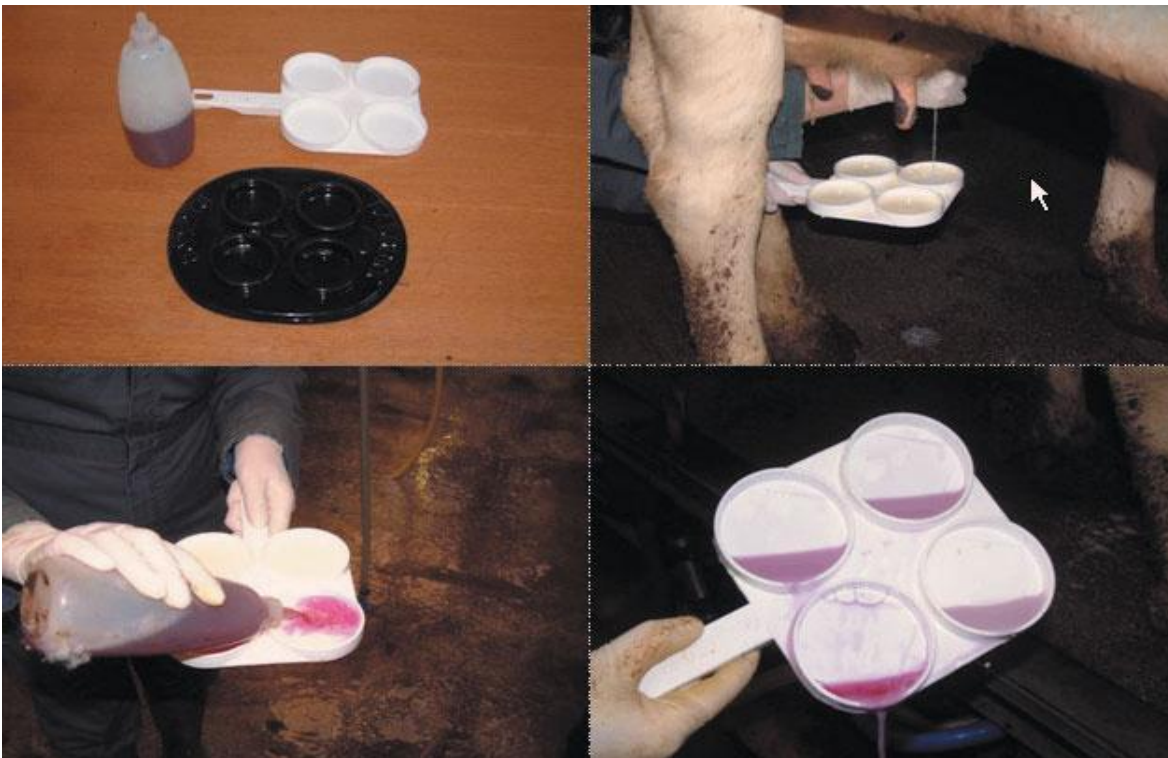


Foto n.5: Esecuzione CMT

Per la nostra prova abbiamo assegnato ai campioni una valutazione qualitativa del CMT e relativo punteggio:

1. Test *negativo*: punteggio 1;
2. Positività *lieve*: punteggio 2;
3. Positività *evidente*: punteggio 3;
4. Positività *conclamata*: punteggio 4.

Conducibilità Elettrica (CE)

Poiché la composizione del latte varia durante la singola mungitura e di conseguenza anche la CE, abbiamo preso come parametro il dato acquisito a metà mungitura. Sono stati considerati patologici i valori superiori a 11.



Foto n. 7: Postazione per misurazione CE

pH

Il valore del pH dei campioni di latte prelevati è stato misurato presso il laboratorio di microbiologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie di Pisa mediante pHmetro (GLP 21, Crison Instruments, Milano, Italia). Sono state eseguite due misurazioni per ciascun campione, proveniente da ciascun quarto, ed è stata ottenuta poi la media matematica tra le 2 misurazioni. La media, quindi, è stata utilizzata per il calcolo della media totale \pm deviazione standard ottenuta sui 4 quarti. Per discernere vacche con mastite da vacche sane, abbiamo utilizzato come intervallo di riferimento fisiologico 6,6-6,8.

Conteggio delle Cellule Somatiche

L'esame è stato eseguito presso un laboratorio consorziato con l'APA di Pisa. La conta delle cellule somatiche è stata eseguita con il metodo Fluoro-opto-elettronico a cella di flusso mediante Fossomatic™FC (Foss Italia, Padova) per il riconoscimento del DNA delle cellule.

Una miscela di latte e soluzione di colorante immersa in un liquido di contenimento è fatta passare nella cella a flusso dove le cellule somatiche colorate sono esposte a una luce con specifica lunghezza d'onda. La cellula emette quindi un impulso di luce fluorescente che è rilevato e contato. La forma della cella a flusso assicura che solamente le cellule somatiche siano rilevate (<http://www.foss.it>). Una mammella sana ha un numero di cellule somatiche inferiore a 200.000/μl (Sharma et al, 2011).

Esame Microbiologico

Ciascun campione di latte è stato seminato tal quale su piastre di agar sangue per spatolamento superficiale dopo omogeneizzazione. L'incubazione è stata effettuata alla temperatura di 37°C per 24 ore in condizioni di aerobiosi.

Il campione di latte è stato raccolto in provette di plastica sterili monouso. Sulle provette era riportato il numero della bovina ed il capezzolo da cui era stato ottenuto il campione stesso; AD: anteriore destro; AS: anteriore sinistro; PD: posteriore destro; PS: posteriore sinistro.

I campioni sono stati trasportati refrigerati al Laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie di Pisa e sono stati processati entro 12 ore dalla raccolta.

Semina su agar sangue (AS): è un terreno nutritivo costituito da Triptose Agar (Oxoid) addizionato con il 5% di sangue di montone. Alcuni batteri crescono su questo terreno formando o meno aloni di emolisi. L'emolisi può essere completa (alfa-emolisi), incompleta (beta-emolisi) o la risultante di entrambe (alfa-beta emolisi). Le eventuali colonie sviluppatesi e caratterizzate da aloni di emolisi, parziale o totale, sono state in seguito sottoposte a colorazione di Gram e a osservazione microscopica.

Le colonie riconducibili per morfologia e affinità tintoriale a stafilococchi o streptococchi sono state valutate mediante il test della catalasi e quindi seminate su terreno selettivo opportuno.

Prova della catalasi: alcuni batteri producono catalasi, enzima che scinde il perossido di idrogeno in ossigeno e acqua. La sintesi della catalasi è uno degli elementi che permette di distinguere i membri della famiglia delle *Micrococcaceae* spp da quelli della famiglia delle *Streptococcaceae* spp (Koneman et al,1997).

Da ogni piastra di Agar Triptosio è prelevata una colonia e stemperata in una goccia di soluzione al 3% di acqua ossigenata su un vetrino porta-oggetto. La comparsa immediata di bollicine (effervescenza) è indicativa della presenza di batteri catalasi-produttori (Ottaviani, 1991).

Nel caso di cocci Gram positivi e catalasi positivi, la semina è stata eseguita su MSA (mannitol salt agar) e Baird Parker. Le piastre con MSA sono state incubate per 48 ore a 37°C, quelle con Baird Parker per 24/48 ore a 37°C.

Nel caso di microrganismi bacillari Gram negativi, la semina è stata fatta su:

- terreni selettivi specifici quali VRBA (Violet Red Bile Agar) con incubazione a 37° per 24 ore: isolamento di coliformi e microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* spp;
- TBX agar (Tryptone Bile X-glucuronide) con incubazione a 42°C per 24 ore: isolamento di *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp.;
- Agar Base e incubazione a 37°C per 24 ore: isolamento di batteri appartenenti alla famiglia delle *Pseudomonadaceae* spp.

Colorazione di Gram e osservazione al microscopio

La colorazione di gram permette di dividere i batteri in due grandi gruppi: Gram-positivi e Gram-negativi. I Gram-positivi si colorano in blu-violetto, mentre i Gram-negativi in rosso. Il diverso comportamento cromatico dei due gruppi è dovuto alla diversa composizione della parete cellulare.

Le colonie da testare sono stemperate in acqua sul vetrino e fissate per mezzo del calore. Su queste vengono versate gocce di Violetto di genziana e lasciate agire per 3 minuti. In seguito, dopo aver lavato con acqua il colorante in eccesso, si procede con il liquido di Lugol per circa 1 minuto. Questo penetra all'interno della cellula e fissa il Cristal-violetto producendo aggregati colorante-iodio e colorando i batteri si coloreranno di blu-porpora. Quindi, dopo un lavaggio con acqua, viene versato sul vetrino l'alcool-acetone, lasciato poi agire per 30 secondi, con l'effetto di allontanare il colorante in eccesso che non si è legato alla parete cellulare. A questo punto i batteri Gram-positivi

appaiono colorati blu-porpora, mentre i Gram-negativi sono incolori. Dopo un successivo lavaggio con acqua, il vetrino viene ricoperto con Safranina, colorante rosso di contrasto, per 2 minuti e successivamente di nuovo lavato con acqua. A questo punto si procede all'osservazione del vetrino al microscopio ottico con obiettivo a immersione (100X) dopo averlo asciugato con carta bibula. I batteri Gram-positivi appariranno colorati in violetto, perché hanno trattenuto il colorante primario (Ottaviani, 1991) e non hanno subito l'effetto della Safranina, la quale non agisce sul preparato già colorato, mentre al contrario i batteri Gram-negativi appariranno di colore rosso.

Analisi statistica

E' stata valutata la correlazione, mediante Spearman test per dati ripetuti, tra cellule somatiche vs CMT, pH e CE. Per poter calcolare la correlazione tra CMT e cellule somatiche, abbiamo considerato per il CMT il quarto con punteggio maggiore come significativo di tutta la mammella. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi per $p < 0,05$.

RISULTATI

Esame clinico mammella

Non sono state rilevate modificazioni di consistenza, volume, presenza di dolore e calore all'esame particolare dell'apparato mammario. Tutte le vacche sono state considerate sane.

Non sono stati rilevati flocculi o coaguli nei primi getti di latte.

California Mastitis Test (CMT)

I risultati relativi al CMT sono riportati in tabella 1a. Non sono state individuate bovine positive a tutti e quattro i quarti al momento del primo prelievo, 4/54 bovine sono risultate positive al CMT per 3 su quattro quarti, con una prevalenza del 7%. Sono risultate positive a due quarti 8/54 (15%) bovine al primo prelievo e 16/54 animali (30%) sono risultati positivi al CMT per un solo quarto al momento del primo prelievo. Infine, sul totale degli esemplari esaminati, sono risultate negative 26/54 bovine con una prevalenza del 48%.

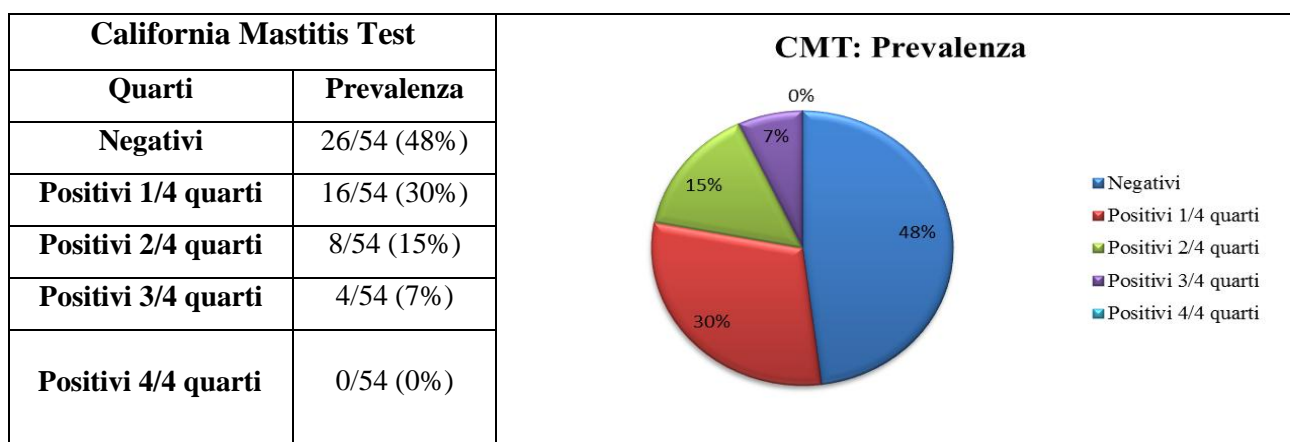


Tabella 1 con grafico. Prevalenza quarti positivi al CMT.

Dal punto di vista qualitativo i risultati del CMT sono riportati in tabella 1b. Per quanto riguarda la positività, 176/216 quarti sono risultati negativi, quindi con punteggio 1 secondo la scala riportata nella sezione "materiali e metodi", con una prevalenza del 81,5%. Trentasei/216 (16,7%) quarti hanno presentato una positività lieve, quindi con punteggio 2. Hanno presentato una positività evidente e punteggio 3, 4/215 (1,8%) quarti. Non sono state evidenziate positività conclamate in nessun quarto campionato.

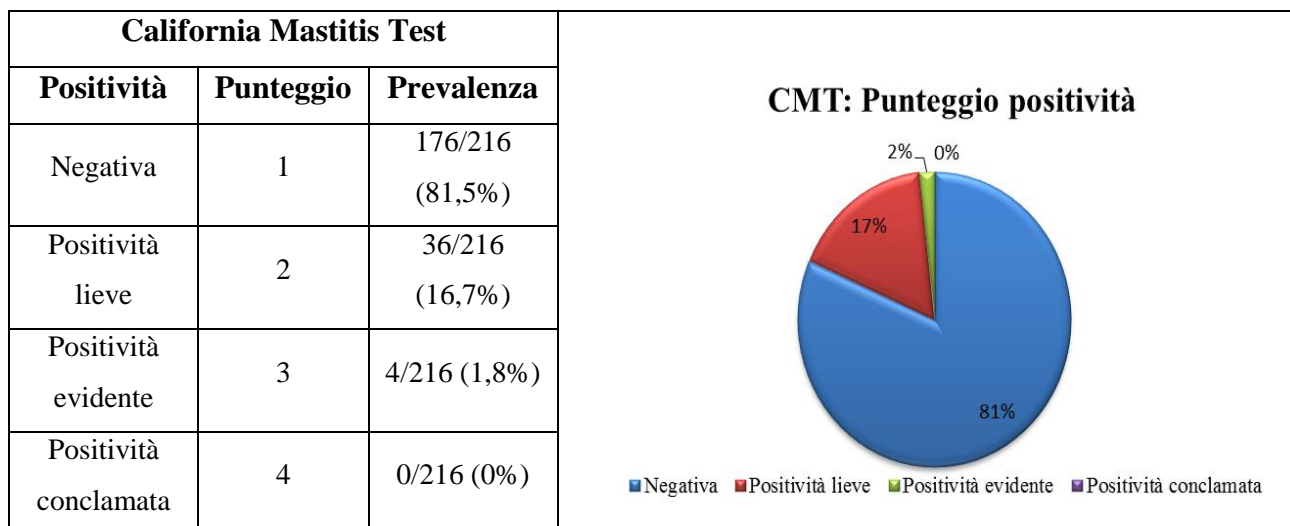


Tabella 1b con grafico. Grado di positività, punteggio e prevalenza di positività al CMT su 216 quarti campionati.

Conducibilità elettrica (CE)

I risultati sulla conducibilità elettrica sono riportati in tabella 2.

n.ro vacca	CE	n.ro vacca	CE	n.ro vacca	CE	n.ro vacca	CE
		14	9,3	28	12,3	42	8,9
1	11,3	15	11,7	29	10,7	43	8,9
2	10,9	16	10	30	9,9	44	11,3
3	12	17	11,7	31	10,4	45	10,3
4	10,3	18	12,3	32	11,3	46	10,7
5	11,2	19	9,6	33	10,7	47	10
6	10,3	20	11,3	34	10,4	48	11,1
7	9,8	21	10,7	35	10,4	49	9,9
8	10,7	22	10,4	36	11,1	50	10,2
9	11,3	23	11,1	37	10,4	51	10,3
10	10,4	24	13,1	38	9,6	52	11,8
11	10,4	25	10,2	39	10,3	53	10
12	10,9	26	11,7	40	9,9	54	11,4
13	11,7	27	10,3	41	9,8		

Tab. 2. Risultati della conducibilità elettrica ottenuti nel presente studio su 54 vacche da latte.

CE nelle bovine

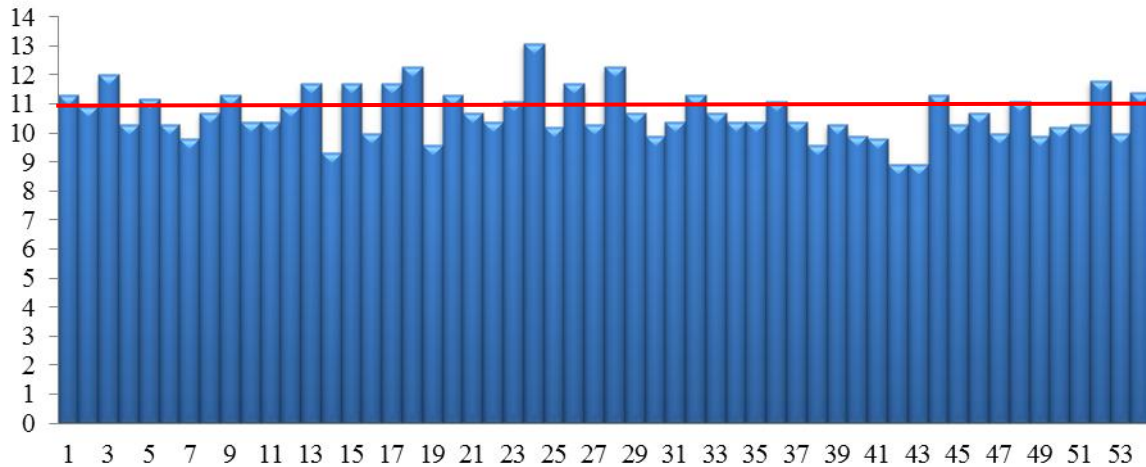


Grafico. 2 Conducibilità Elettrica nelle 54 bovine

Secondo i risultati ottenuti sulla conducibilità elettrica (CE), nel presente studio 35/54 (64,8%) vacche hanno presentato una CE inferiore a 11, risultando quindi non affette da mastite, mentre 19/54 (35,2%) animali presentavano una CE di massa superiore a 11. Questi animali, quindi, sono stati considerati affetti da mastite.

pH

I valori di pH sono stati valutati su ciascun quarto, quindi è stata calcolata media (X) \pm deviazione (DS) standard. I risultati relativi alla $X \pm DS$ del pH sono riportati in tabella 3. Nel presente studio 46/54 (85,2%) vacche presentavano un pH del latte compreso tra 6,6 e 6,8, mentre 8/54 (14,8%) vacche avevano un pH del latte superiore a 6,8. La valutazione del pH è risultata aumentata in 3/54 vacche su tutti e quattro i quarti. 6/54 bovine hanno manifestato valori superiori ai range di riferimento per il latte proveniente da 1 quarto, mentre il latte di 3/54 bovine presentava un pH alterato su 2 su 4 quarti. Infine, 1/54 bovine hanno manifestato valori di pH superiori ai range in 3 su 4 quarti. In tutti i casi di valori di pH alterati nei quattro quarti, risultava alterata anche la media totale dei pH, cioè quella calcolata sui 4 quarti. In 2/6 bovine con pH alterato in 1 su 4 quarti risultava alterata anche la media totale. In 1/3 animali con pH alterato in 2 su 4 quarti, la media totale era alterata e in una vacca con pH alterato in 3 su 4 quarti, era alterata anche la media totale.

Valutazione pH											
	A	B	C	D	X±DStot		A	B	C	D	X±DStot
1	6,77	6,78	6,73	6,76	6,76±0,02	28	6,73	6,76	6,75	6,88	6,78±0,07
2	6,70	6,72	6,75	6,79	6,74±0,03	29	6,73	6,72	6,73	6,73	6,72±0,00
3	6,72	6,71	6,74	6,94	6,78±0,10	30	6,82	6,87	6,83	6,83	6,83±0,02
4	6,67	6,75	6,64	6,73	6,70±0,05	31	6,68	6,69	6,70	6,68	6,69±0,01
5	6,81	7,28	6,79	6,81	6,92±0,23	32	6,73	7,45	6,73	6,78	6,92±0,35
6	6,86	6,83	6,87	6,85	6,80±0,02	33	6,83	6,86	6,87	6,89	6,86±0,02
7	6,73	6,79	6,82	6,84	6,79±0,04	34	6,58	6,62	6,47	6,60	6,57±0,07
8	6,79	6,78	6,79	6,79	6,79±0,00	35	6,73	6,73	6,78	6,8	6,76±0,03
9	6,84	6,80	6,83	6,79	6,81±0,02	36	6,85	6,82	6,88	6,82	6,84±0,03
10	6,77	6,77	6,78	6,78	6,77±0,00	37	6,87	6,85	6,86	6,81	6,84±0,02
11	6,83	6,94	7,16	6,84	6,94±0,15	38	6,73	6,75	6,81	6,74	6,75±0,03
12	6,70	6,73	6,71	6,68	6,70±0,02	39	6,61	6,65	6,60	6,61	6,61±0,02
13	7,03	7,01	7,05	6,90	6,99±0,60	40	6,73	6,74	6,76	6,75	6,74±0,02
14	6,77	6,77	6,82	6,80	6,79±0,02	41	7,16	6,72	6,79	6,78	6,86±0,20
15	6,78	6,85	6,84	6,84	6,82±0,03	42	6,73	6,76	6,74	6,75	6,74±0,02
16	6,66	6,71	6,63	6,66	6,66±0,03	43	6,76	6,75	6,8	6,8	6,78±0,03
17	6,96	7,01	6,86	7,00	6,95±0,07	44	6,76	6,76	6,73	6,74	6,75±0,01
18	6,72	6,68	6,67	6,61	6,67±0,04	45	6,83	-	6,85	6,85	6,84±0,01
19	6,73	6,76	6,80	6,77	6,76±0,03	46	6,84	6,84	6,83	6,76	6,81±0,04
20	6,80	6,79	6,79	6,73	6,78±0,03	47	6,76	6,78	6,78	6,76	6,77±0,01
21	6,66	6,76	6,81	6,76	6,75±0,06	48	6,95	6,93	6,94	6,86	6,92±0,04
22	6,76	6,80	6,80	6,79	6,79±0,02	49	6,75	6,85	6,79	6,82	6,80±0,04
23	6,71	6,79	6,77	6,65	6,73±0,06	50	6,78	6,72	6,74	6,7	6,73±0,03
24	6,78	6,78	6,76	6,91	6,80±0,07	51	6,81	6,81	6,80	6,81	6,80±0,00
25	6,74	6,79	6,79	6,8	6,78±0,03	52	6,68	6,62	6,80	6,74	6,71±0,08
26	6,64	6,71	6,68	6,66	6,67±0,03	53	6,72	6,65	6,70	6,83	6,72±0,07
27	6,71	6,70	6,72	6,75	6,72±0,02	54	6,75	6,75	6,77	6,78	6,76±0,01

Tabella 3. Risultati de pH, espressi in media e deviazione standard dei pH valutati sui singoli quarti. Legenda – X: media; DS: deviazione standard; tot: media totale ottenuta sui 4 quarti; A: quarto anteriore sinistro; B: quarto anteriore destro; C: quarto posteriore sinistro; D: quarto posteriore destro.

Conta Cellule Somatiche (CCS)

I valori delle cellule somatiche sono stati calcolati sul latte proveniente dai quattro quarti e i risultati sono riportati in Tabella 4. Diciannove/54 (35,2%) bovine hanno riportato valori di cellule somatiche > 200.000/ml risultando perciò positive; 35/54 (64,8%) hanno riportato valori di cellule somatiche <200.000/ml.

CCS (cell.10 ³ /ml)							
n.ro vacca	CCS	n.ro vacca	CCS	n.ro vacca	CCS	n.ro vacca	CCS
<i>1</i>	23	<i>15</i>	197	<i>29</i>	59	<i>43</i>	308
<i>2</i>	262	<i>16</i>	20	<i>30</i>	33	<i>44</i>	23
<i>3</i>	152	<i>17</i>	3783	<i>31</i>	1892	<i>45</i>	81
<i>4</i>	96	<i>18</i>	453	<i>32</i>	106	<i>46</i>	129
<i>5</i>	206	<i>19</i>	133	<i>33</i>	3103	<i>47</i>	151
<i>6</i>	61	<i>20</i>	192	<i>34</i>	150	<i>48</i>	206
<i>7</i>	321	<i>21</i>	81	<i>35</i>	143	<i>49</i>	43
<i>8</i>	111	<i>22</i>	59	<i>36</i>	238	<i>50</i>	200
<i>9</i>	348	<i>23</i>	58	<i>37</i>	278	<i>51</i>	44
<i>10</i>	125	<i>24</i>	866	<i>38</i>	432	<i>52</i>	86
<i>11</i>	326	<i>25</i>	865	<i>39</i>	23	<i>53</i>	160
<i>12</i>	150	<i>26</i>	397	<i>40</i>	128	<i>54</i>	33
<i>13</i>	134	<i>27</i>	404	<i>41</i>	377		
<i>14</i>	34	<i>28</i>	854	<i>42</i>	106		

Tabella 4. Numero di cellule somatiche per capo bovino.

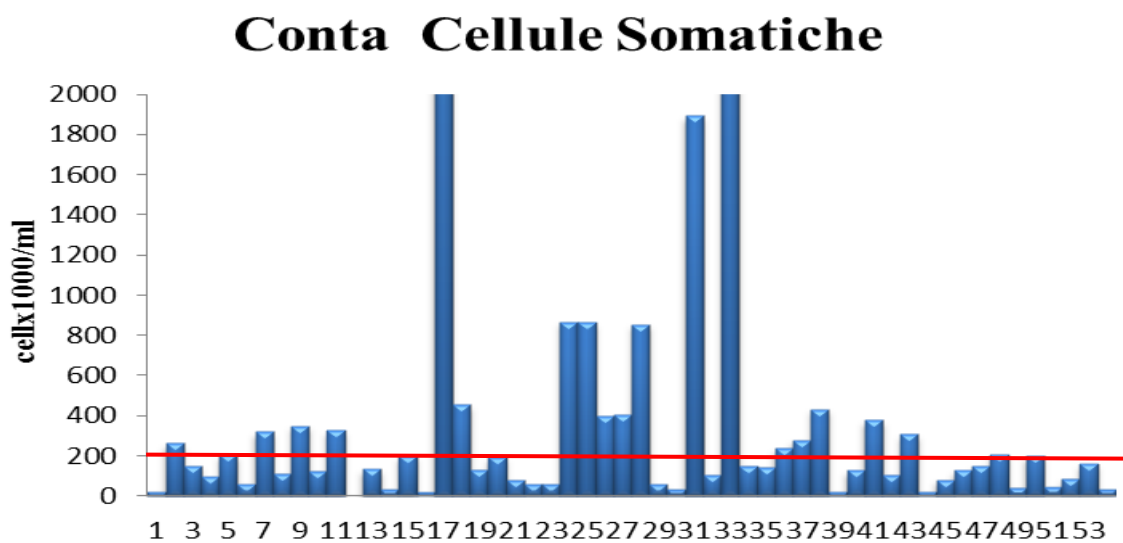


Grafico 3. Conta delle Cellule Somatiche nelle 54 bovine

Esame Microbiologico

L'esame batteriologico del latte (Tab.5a) è risultato negativo in 23/54 (42,5%) bovine. Dieci/54 bovine (18,5%) presentavano positività al campione di latte proveniente da 1 quarto su 4; 5/54 (9%) bovine sono risultate positive per 2 su 4 quarti e per 3 su 4 quarti. Infine 11/54 (20%) bovine sono risultate positive all'esame batteriologico per tutti i quarti.

Quarti	Prevalenza
Negativi	23/54 (42,5%)
Positivi ¼ quarti	10/54 (18,5%)
Positivi 2/4 quarti	5/54 (9%)
Positivi ¾ quarti	5/54 (9%)
Positivi 4/4 quarti	11/54 (20%)

Esame Batteriologico: analisi per quarti

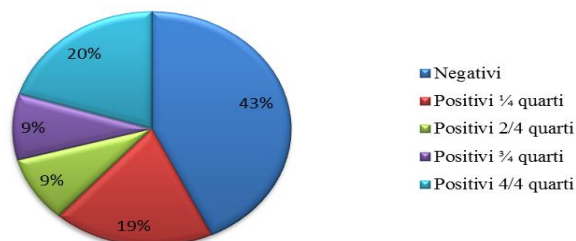


Tabella 5 e grafico. Positività e prevalenza dei quarti all'esame batteriologico nei campioni raccolti

Per quanto riguarda la raccolta dei dati qualitativi dell'esame batteriologico i risultati sono riportati in tabella 5b. Sono risultati negativi 137/216 quarti con una prevalenza del 63%, sono risultati positivi a Stafilococchi coagulasi negativi 52/216 (24,5%) quarti; 21/216 (10%) quarti presentavano un positività per batteri Coliformi, 3/216 (1,5%) quarti erano invece positivi a E. coli. Infine 1/216 (0,5%) quarti è risultato positivo a S. marcescens e 1/216 (0,5%) quarti è risultato positivo a Stafilococchi coagulasi positivi.

Batteri isolati	Prevalenza
Nessuno	137/216 (63%)
Stafilococchi coagulasi -	52/216 (24,5%)
Coliformi	21/216 (10%)
Escherichia coli	3/216 (1,5%)
Serratia marcescens	1/216 (0,5%)
Stafilococchi coagulasi +	1/216 (0,5%)

Batteriologico: Prevalenza patogeni

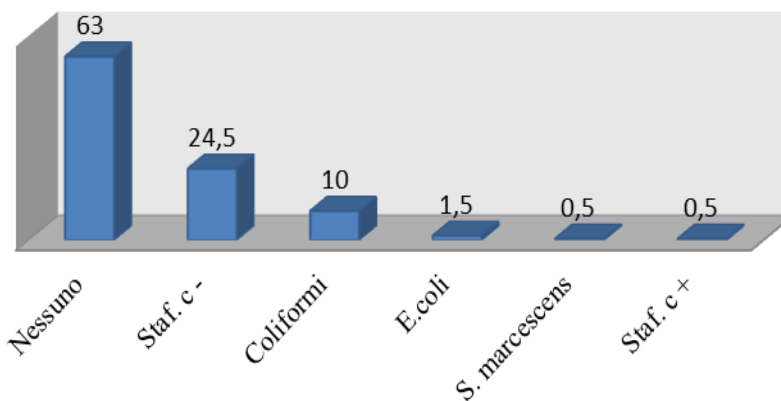


Tabella 5b e grafico. Risultati qualitativi esame batteriologico

Analisi statistica

Non è stata trovata una correlazione statisticamente significativa tra conta delle cellule somatiche (CCS) *vs* CMT, *s* pH e conducibilità elettrica.

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Le mastiti rappresentano una delle patologie a più alto impatto sociale, economico, zootecnico e veterinario nell'allevamento della vacca da latte (Viguier et al, 2009; Sharma et al, 2011). Esse sono caratterizzate da cambiamenti fisici, chimici e batteriologici del latte, nonché da cambiamenti patologici a livello della mammella e del capezzolo (Sharma, 2007). Per la diagnosi di mastite, e in generale di scarsa igiene del latte, sono disponibili in commercio alcuni test da campo, che possono essere utilizzati direttamente in sala mungitura, come ad esempio il California Mastitis test (CMT), il Sodium Lauryl Sulphate Test (SLST), il Surf Field Mastitis Test (SFMT) e il White Side Test (WST). Questi test hanno il vantaggio di essere di semplice esecuzione per gli operatori in campo e con risultati ottenibili immediatamente.

Come già descritto, nel presente studio è stato utilizzato il California Mastitis Test. Il test è risultato agevole e di facile esecuzione ed interpretazione. Il 48% dei soggetti presi in esame sono risultati negativi a questo primo screening, mentre il restante 52% dei soggetti è risultato positivo per almeno uno dei quattro quarti. Poiché non è stata trovata una correlazione statisticamente significativa fra il CMT e conta delle cellule somatiche, considerato il *gold standard*, sembra che il CMT non possa essere utilizzato come test di screening in sostituzione della conta delle cellule somatiche. Questo può essere anche ipotizzato dal fatto che, nel nostro studio, la prevalenza di vacche mastitiche individuato con il CMT sembra essere sovrastimato rispetto alla prevalenza individuata con il conteggio delle cellule somatiche (52% vs 35,2%).

La conducibilità elettrica (CE) ha riportato che il 35,2% delle bovine presentavano valori superiori a 11 Ohm. La CE aumenta nel caso di latte mastitico, tuttavia questo dato da solo non può essere interpretato poiché la sua sensibilità e specificità variano molto da un'azienda a un'altra e deve dunque essere supportato da altri test maggiormente attendibili (Pisoni, 2007). Nel nostro studio non abbiamo rilevato una correlazione statisticamente significativa fra la CE e la CCS, quindi la CE non sembra essere un test molto attendibile per eseguire uno screening tra vacche "mastitiche" e "sane", sebbene le prevalenze individuate con la CE e con la CSS sono praticamente sovrapponibili.

Per quanto riguarda il pH, nel presente studio solo il 14,8% delle bovine presentava un pH del latte alterato, prevalenza bassa se confrontata con quanto riportato in bibliografia. Questa conclusione è anche avvalorata dal fatto che la prevalenza di vacche mastitiche individuate mediante la valutazio-

ne del pH è nettamente inferiore a quella rilevata con la CCS (14,8% vs 35,2%). Quindi il pH risulta poco attendibile per la valutazione delle mastiti e delle mastiti subclinici.

La conta delle cellule somatiche è stata ampiamente descritta in letteratura come metodo valido per l'indagine di mastiti e mastiti subcliniche sia nella mandria, che nella singola bovina, e per la valutazione delle caratteristiche sanitarie del latte vaccino (Viguier et al, 2009; Sharma et al, 2011). Come valore di *cut-off*, significativo per diagnosi di mastite, è stato indicato 200.000 cell/ml dalla International Dairy Federation nel 1997 (Hillerton, 1999; Schukken et al. 2003; Viguier et al, 2009; Sharma et al, 2011). In bibliografia è stato ulteriormente riportato che, sopra tale valore, aumenti significativamente la prevalenze di campioni di latte positivi all'esame batteriologico (Sharma et al, 2011). Nonostante che nel panorama odierno esistano tendenze opposte, da un lato si vorrebbe ridurre il valore di *cut-off* a 100.000 cell/ml, dall'altro alcuni autori tollererebbero valori di CCS superiori a 500.000 cell/ml, sembra essersi a oggi delineata un'idea comune nell'indicare come valore di mastite una quantità superiore a 200.000 cell/ml per il singolo quarto e maggiore a 400.000 cell/ml per il latte di massa (Hillerton, 1999). Il 35,2% degli animali inclusi nel presente studio presentava una CCS >200.000 cell/ml, risultando positivi a questo parametro. Nessuna delle bovine, tuttavia, presentava manifestazioni cliniche di mastite, avvalorando la tesi che la CCS sia un'indagine valida per la diagnosi delle forme subcliniche di mastite.

L'esame batteriologico è risultato positivo per almeno 1 su 4 quarti per il 57,5% delle bovine. La popolazione maggiormente rappresentata è stata quella degli Stafilococchi coagulasi negativi (SCN) (53/216 quarti tot. con una prevalenza del 24,5% sul totale) di cui esistono oltre 50 specie (Pyörälä, 2009). Le più comuni (*S. epidermidis*, *S. chromogenes* e *S. haemolyticus*) sono patogeni opportunisti che ritroviamo comunemente sull'epidermide degli animali e possono diventare patogeni in quei soggetti con abbassamento delle difese immunitarie. Il restante campione positivo all'esame batteriologico vedeva coinvolti batteri Coliformi ed *E. coli*, tipici patogeni ambientali che ritroviamo comunemente negli spazi in cui vivono le bovine e che possono penetrare nella mammella nel periodo di tempo fra una mungitura e la successiva; *S. marcescens*, batterio che solitamente conferisce al latte una tipica colorazione rosa e Stafilococchi coagulasi positivi.

BIBLIOGRAFIA

Amadori M. Bertocchi L. (2005)“ Benessere Animale e mastite bovina: Nuove prospettive di Intervento” Atti della Società Italiana di Buiatria vol. XXXVII

Ballarini,G.(1994) – Malattie della bovina da latte ad alta produzione BLAP, Edagricole, Bologna.

Barberio A. et all. 2006 “Scelta ed interpretazione degli esami di laboratorio nella diagnosi della mastite Bovina” Buiatria Journal of the Italian Association for Buiatrics pp. 227-240

Barkema H.W., Schukken Y.H., Lam T.J.G.M., Beiboer M.L., Benedictus G., Brand A. (1998) - Management practices associated with low, mid, and high bulk milk somatic cell count. J. Dairy Sci., 81: 1917-1927.

Caroline Viguier, Sushrut Arora, Niamh Gilmartin, Katherine Welbeck and O’Kennedy (2009) “Mastitis detection: current trends and future perspectives” Trends in Biotechnology Vol.27 No.8

Hillerton JE 1999. Redefining mastitis based on somatic cell count. IDF Bulletin 345: 4-6.

K. K. Reyher e I. R. Dohoo (2011) - Diagnosing intramammary infections: Evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections - J. Dairy Sci. issue 94 pagg. 3387 – 3396

Koneman E., Allen S., Janda W., Schreckenberger P., Winn W. (1997) in “Color Atlas and Textbook of diagnostic Microbiology”, 5^a edizione, Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia Cap.11 pp. 539-576.

Ottaviani F. (1991) “L’analisi microbiologica dei prodotti lattiero-caseari”, Ed. Tecniche nuove, Milano, pp.216-246.

Pisoni G (2007). Diagnosti In: La mastite nell’allevamento della bovina da latte. I manuali pratici di professione allevatore. Poin Veterinaire Italie ed 1° edizione. Milano, Italia.

Pyörälä S and Taponen S, 2009. Coagulase-negative staphylococci- Emerging mastitis pathogens.

Rosenberger G. (1979) “L’esame clinic del bovino” Ed Italiana sulla II ted. A cura di Sali G &Vacirca G., Ed. Essegivi Piacenza.

Schukken YH et al., (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. Vet Res 34, 579-596.

Sharma N, Singh NK and Bhadwal MS (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. *Asian-Aust J Anim Sci* 24(3): 429-438.

Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K and O’Kennedy R (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology* 27 (8), 486-493.