

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA E
PRODUZIONI ANIMALI**



**DOTTORATO DI RICERCA IN
PRODUZIONE E SANITÀ DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE
ANIMALE**

- XXVIII CICLO -

***"ISOLAMENTO DI AGENTI MASTITOGENI E RIFLESSI
AMBIENTALI SULL'ALLEVAMENTO BUFALINO"***

**Relatore e Tutor:
Chiar. mo Prof. Giuseppe Campanile**

**Candidata:
Dr.ssa Sandra Nizza**

Settore Scientifico disciplinare: AGR 19

**Coordinatore :
Chiar. ma Prof. ssa Maria Luisa Cortesi**

*Più studio la natura,
più rimango meravigliato del lavoro del Creatore.
Louis Pasteur*

Indice

ABSTRACT	Pag. 1
1. Introduzione	Pag. 12
1.1 Le origini del bufalo	Pag. 14
CAPITOLO 1	Pag. 17
2. L'allevamento bufalino	Pag. 17
2.1 Principali problematiche dell'allevamento bufalino	Pag. 17
2.2 La stabulazione	Pag. 19
2.3 Qualità del latte	Pag. 22
2.4 Le variazioni delle caratteristiche qualitative del latte di bufala	Pag. 24
3. Cenni di anatomia e fisiologia della ghiandola mammaria nella bufala	Pag. 32
3.1 Anatomia della mammella	Pag. 32
3.2 Fisiologia della mammella	Pag. 42
3.3 Il ruolo dell'ossitocina	Pag. 44
3.4 Sinergismo ambiente/ormone	Pag. 46
4. Cenni sulla pratica della mungitura nella bufala e sulle problematiche ad essa correlate	Pag. 49
4.1 Gli impianti e la sala mungitura	Pag. 49
4.2 La mungitura	Pag. 58
4.3 La mungibilità	Pag. 66
CAPITOLO 2	Pag. 70
5. Cenni sul processo flogistico a carico della mammella	Pag. 70
5.1 La mastite	Pag. 70
5.2 Diagnosi eziologica e clinica di mastite e patogenesi	Pag. 74
5.3 Cambiamenti delle cellule somatiche in corso di mastite	Pag. 81
5.4 Protocollo di intervento in corso di mastite	Pag. 86
5.5 Importanza economica della mastite	Pag. 89
5.6 Allestimento dell'antibiogramma	Pag. 91

5.7 Trattamento della mastite e problema dell'antibiotico resistenza	Pag. 93
5.8 Le mastiti nella bufala	Pag. 95
CAPITOLO 3	Pag. 100
6. Scopo del progetto di ricerca	Pag. 100
7. Materiali e Metodi	Pag. 101
7.1 Esperimento 1	Pag. 101
7.2 Esperimento 2	Pag. 101
7.3 Esperimento 3	Pag. 106
7.4 Analisi statistica	Pag. 109
CAPITOLO 4	Pag. 110
8. Risultati e Discussione	Pag. 110
8.1 Esperimento 1	Pag. 110
8.2 Esperimento 2	Pag. 115
8.3 Esperimento 3	Pag. 119
9. Conclusioni	Pag. 131
10. Bibliografia	Pag. 133
11. Ringraziamenti	Pag. 165

ABSTRACT

The milk is universally recognized a complete diet due to its chemical-nutritional characteristics and can be considered one of the most important human food. However, its quality can worsen after mastitis occurrence in both dairy cattle and buffalo. Mastitis are largely widespread in dairy herds and cause severe milk yield and quality losses, paid directly by milk producers and indirectly by consumers. Both cattle and buffalo are susceptible to mastitis, in particular in developing countries, resulting in health hazards: in fact, pathogens bacteria that cause mastitis can be conveyed through milk and be responsible of diseases in humans (zoonosis). The clinical mastitis is an individual problem and it is characterized by changes in udder and milk. On the contrary, subclinical mastitis can be considered a herd problem, since the animals become healthy carriers of pathogens that can spread in the herd. The purpose of the research carried out during the PhD was to detect:

- a) The seasonality of the mammary gland health status in buffaloes undergone milk recording;
- b) The frequency of isolation of the main germs isolated from the milk of clinically healthy buffaloes or buffaloes with

clinical/subclinical mastitis, according to the seasonality. Furthermore, the antimicrobial resistance of these bacteria was tested over a period of six years (2010-2015);

- c) The timing and the histo-pathological modifications of the mammary gland following mastitis by specific agents.

Experiment 1. In the first phase of the trial a statistical analysis was carried out on about 700,000 specimens, collected from about 100,000 buffaloes recorded by the National Association of Buffalo Breeders (ANASB) during the last 10 years. Milk yield and somatic cell count measured by Milkoscan were recorded.

Experiment 2. A total of 3,585 milk samples (1745 positive to mastitis agents) were collected and cultured on different media for isolation and identification of bacterial species. The cultural and colony characteristics of the growing bacteria were examined and isolated bacteria were tested for sensitivity to antibiotics using the Kirby-Bauer's method.

Experiment 3. In order to assess the hystopathological damages of the mammary gland and the pathogens involved, a trial was carried out in a farm located in Foggia province. Buffaloes with more than 300,000 somatic cells and without a history of clinical mastitis, were selected and slaughtered in three periods: February, May and July. Mammary glands were collected and swabs were carried out for each quarter for

microbiological examination. The swabs were processed for infectious bacteria, zoonotic agents and environmental or other opportunists germs. The isolated colonies underwent biochemical, enzymatic and serological tests.

A statistical analysis was performed by *Chi-square test*.

Experiment 1. Data recorded over a period of 10 years from 100,000 buffaloes undergone milk recording clearly showed the results regarding the application of the “out of season breeding mating” (OBSM) technique. In fact, a drastic reduction of milk production was recorded in primiparous buffaloes from August/September, while a less severe reduction was observed in pluriparous counterparts. It is also worth pointing out that milk production recorded in primiparous animals was about 10% lower than that recorded in pluriparous. The application of the OBSM technique is also highlighted by somatic cell count, that was affected by milk yield and days in milk. In fact somatic cell count was constant and lower than 300,000 (limit of MD 882/2004) throughout the year, except in December, when a higher incidence of both subjects at the end of lactation and subjects at the beginning of lactation is recorded, compared to the other months. In any case, the level lower of 300,000 somatic cells suggests that health of the udder.

Experiment 2. The most common bacteria isolated in milk samples positive to mastitis agents were *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*.

Experiment 3. An analysis of the udders recovered at the slaughterhouse from buffaloes with more than 300,000 somatic cells revealed no signs due to acute mastitis after a macroscopic examination. However, in some cases, a teat and milk ducts thickening was observed, together a significant fibrosis. The microbiological examination revealed the presence of different Gram positive and negative bacteria examined. *Staphylococcus spp.* was isolated in 100% of the samples, it was possible to identify *S. aureus* in over 23% of cases (7/30): this bacterium is widely recognized as one of the main mastitis agents in both in cattle and buffalo. Clear signs of mastitis were observed by the histological analysis in 18/19 samples of udders collected in February and May (94.5%): in 12 of these (63.2%) significant lesions in the mammary gland ducts, interstitium and teats were assessed. In 10/11 mammary glands collected in July (90.1%) marked interstitial lesions characterized by lymphoplasmocytic infiltration and fibrosis, together with teats lesions were highlighted.

Immunohistochemical and immunofluorescence investigations, showed the presence of CD8 positive lymphocytes in the interstices and in the epithelium.

Mastitis is one of the main diseases found buffalo species. The data reported in this study can be a wake-up call if the somatic cell count is considered. In fact higher values than those considered pathological for bovine were observed in more than 20% of the samples analyzed from the population subjected to milk recording. Further studies are needed to debug a preventive approach for mastitis control and their diffusion in the herd. Furthermore, the analysis of mammary gland samples revealed no signs of acute mastitis. Only in some cases a thickening was visible, localized especially in the teats and milk ducts, where a significant fibrosis was appreciated and the microbiological examination revealed the presence of both Gram positive and negative bacteria. Finally, major attention would be paid to the agronomic and climatic conditions of the region, variations in socio-cultural practices, milk market, feeding and management, which can be considered critical points in increasing the incidence of subclinical mastitis.

Keywords : Mastitis, buffaloes, milk, bacteria, seasonality.

RIASSUNTO

Il latte è universalmente riconosciuto come dieta completa per le sue caratteristiche chimico-nutrizionali e può essere considerato uno dei più importanti alimenti umani. Tuttavia, la sua qualità può peggiorare col verificarsi della mastite sia nei bovini da latte che nei bufali. Le mastiti sono ampiamente diffuse negli allevamenti da latte e causano gravi perdite di produzione e qualità del latte, penalizzando direttamente i produttori di latte e, indirettamente, i consumatori. Entrambi, bovini e bufali, sono suscettibili alla mastite, in particolare nei paesi in via di sviluppo, con conseguente pericolo per la salute: infatti, i batteri patogeni che causano la mastite possono essere trasmessi attraverso il latte ed essere responsabili di malattie nell'uomo (zoonosi). La mastite clinica è un problema individuale ed è caratterizzato da cambiamenti nella mammella e del latte. Al contrario, la mastite subclinica può essere considerata un problema della mandria, poiché gli animali diventano portatori sani di agenti patogeni che possono diffondersi in allevamento. Lo scopo della ricerca condotta durante il Dottorato è stato quello di rilevare :

- a) La stagionalità dello stato sanitario della mammella nelle bufale sottoposte a controllo funzionale;
- b) La frequenza di isolamento, in base anche alla stagionalità, dei principali microrganismi isolati da latte di bufale clinicamente sane o con mastiti cliniche/subcliniche ed il tasso di resistenza degli stessi agli antimicrobici testati e di valutarne il trend in un periodo di 6 anni, dal 2010 al 2015;
- c) Il decorso e le modificazioni isto-patologiche in corso di mastiti da agenti specifici.

Esperimento 1. Nella prima fase del processo è stata condotta un'analisi statistica su circa 700,000 esemplari, raccolti da circa 100,000 bufale registrate dall'associazione nazionale allevatori specie bufalina (ANASB) nel corso degli ultimi 10 anni. Sono state registrate le produzioni e rilevati i dati relativi al conteggio delle cellule somatiche analizzati mediante Milkoscan.

Esperimento 2. Sono stati raccolti un totale di 3.585 campioni di latte (1745 positivi ad agenti mastitici) che sono stati coltivati su diversi media per l'isolamento e l'identificazione delle diverse specie batteriche. Sono state esaminate le caratteristiche culturali dei ceppi batterici isolati che a sua volta sono stati testati per la sensibilità agli antibiotici utilizzando il metodo di Kirby-Bauer.

Esperimento 3. Al fine di valutare i danni istopatologici a carico della ghiandola mammaria e gli agenti patogeni coinvolti, è stato condotto uno studio in un'azienda situata nella provincia di Foggia. I bufali con più di 300,000 cellule somatiche e senza una storia di mastite clinica, sono stati selezionati e macellati in tre periodi: febbraio, maggio e luglio. Sono stati effettuati tamponi per ogni quarto delle mammelle e sottoposti a esame microbiologico. I tamponi sono stati processati per la ricerca di batteri infettivi, agenti zoonotici, ambientali o altri agenti opportunisti. Le colonie isolate sono state sottoposte a test biochimici, enzimatici e sierologici.

L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test *chi-quadro*.

Esperimento 1. I dati registrati in un periodo di circa 10 anni su 100,000 bufale sottoposte a controlli funzionali, hanno mostrato risultati rilevanti per quanto riguarda l'applicazione della tecnica di "destagionalizzazione" (OBSM). In effetti, è stata registrata una drastica riduzione della produzione di latte nelle bufale primipare ad agosto/settembre, mentre nelle pluripare la riduzione del latte prodotto risulta meno drastica. Vale anche la pena sottolineare che la produzione di latte registrata nelle primipare è stata inferiore di circa il 10% rispetto a quanto registrato nelle pluripare. L'applicazione della tecnica OBSM è evidenziata anche

dal numero delle cellule somatiche, che è influenzato dalla produzione di latte e dalla distanza dal parto. In realtà il valore della conta delle cellule somatiche è rimasto costante ed inferiore a 300,000 (limite del DM 882/2004) durante tutto l'anno, tranne che nel mese di dicembre, in cui si è registrata una maggiore incidenza di entrambi i soggetti a fine lattazione e soggetti all'inizio della lattazione, rispetto agli altri mesi. In ogni caso, il livello più basso di 300,000 cellule somatiche suggerisce uno stato sanitario della mammella ineccepibile.

Esperimento 2. I principali batteri isolati dai campioni di latte risultati positivi agli agenti responsabili di mastite sono stati *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*.

Esperimento 3. Dall'analisi delle mammelle recuperate al macello è stato interessante notare che l'esame macroscopico non ha evidenziato alcun segno riferibile a mastite acuta. Tuttavia, in alcuni casi era visibile un ispessimento, localizzato in particolare a livello del capezzolo e dei dotti galattofori, dove era apprezzabile una consistente fibrosi. L'esame microbiologico ha rivelato la presenza di diversi batteri sia Gram positivi che Gram negativi dalle mammelle esaminate. E' stato isolato nel 100% dei campioni lo *Staphylococcus spp.*, è stato possibile identificare *S. aureus* in oltre il 23% dei casi, (7/30): questo batterio è ampiamente

riconosciuto come uno dei principali agenti di mastite sia nei bovini che nei bufali. Chiari segni di mastite sono stati osservati con l'analisi istologica su 18/19 campioni di mammelle prelevati nei mesi di febbraio e maggio (94,5%): in 12 di questi (63,2%), sono state evidenziate lesioni significative a livello di dotti galattofori, ma soprattutto di interstizio e di capezzolo. In 10 delle 11 mammelle prelevate a luglio (90,1%) sono state evidenziate marcate lesioni interstiziali caratterizzate da infiltrazione linfoplasmacellulare e da fibrosi e lesioni capezzolari. Indagini di immunohistochimica e di immunofluorescenza, hanno mostrato la presenza di CD8 positivi negli interstizi e nell'epitelio.

La mastite è una delle principali patologie riscontrate nella specie bufalina. I dati riportati in questo studio possono essere un campanello d'allarme se consideriamo la conta delle cellule somatiche. Infatti oltre il 20% dei campioni analizzati dall'intera popolazione sottoposta a controlli funzionali fanno registrare valori superiori a quelli considerati patologici per la specie bovina. Ulteriori studi sono necessari per eseguire un approccio preventivo per il controllo della mastite e la loro diffusione in allevamento. Inoltre, l'analisi dei campioni della ghiandola mammaria non ha rivelato segni di mastite acuta. Solo in alcuni casi è stato visibile un ispessimento, localizzato soprattutto nei capezzoli e nei dotti del latte, dove è stata apprezzata una fibrosi significativa e l'esame

microbiologico ha rivelato la presenza di entrambi i batteri Gram positivi e negativi. Infine, maggiore attenzione dovrà essere rivolta alle condizioni agronomiche e climatiche della regione, alle variazioni nelle pratiche socio-culturali, al commercio del latte, all'alimentazione e al management aziendale, che possono essere considerati punti critici per aumentare l'incidenza di mastite subclinica.

Parole chiave : mastite, bufali, latte, batteri, stagionalità.

1. INTRODUZIONE

La popolazione bufalina mondiale, secondo i dati FAO aggiornati al 2013, stima all'incirca 194 milioni di capi di cui 109 milioni in India, 33 in Pakistan, 23 in Cina, 5,2 in Nepal e 4 in Egitto. In Italia si stima la presenza di circa 400.000 capi. La popolazione bufalina, nei primi tre Paesi, secondo i dati FAO (2013), consiste in circa 165 milioni di capi. Se aggiungiamo gli altri paesi asiatici (Tailandia, Indonesia, Filippine, Vietnam, Bangladesh, Nepal, Sri Lanka, Myanmar, Laos, Cambogia, Iran) raggiungiamo in Asia il 97 % dell'intera popolazione mondiale. Come si può osservare dal grafico sottostante, la popolazione mondiale è tuttora in crescita.

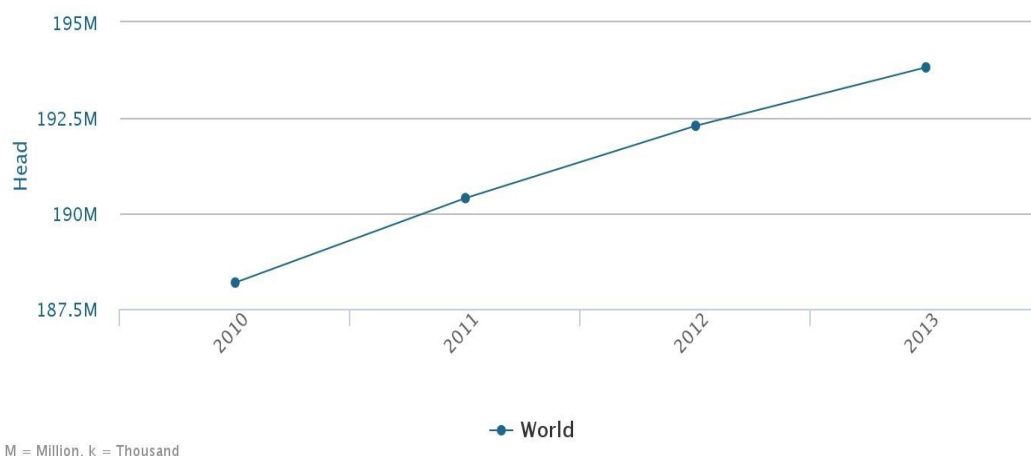


Figura 1. Trend popolazione bufalina mondiale in milioni (M) di capi

In Italia attualmente la zona di provenienza del latte, di trasformazione e di elaborazione del formaggio "Mozzarella di Bufala Campana" comprende il territorio amministrativo di seguito specificato :

- **Regione Campania** che comprende l'intero territorio della Provincia di Caserta e della Provincia di Salerno. Inoltre comprende diversi comuni della Provincia di Napoli e della Provincia di Benevento;
- **Regione Lazio** che comprende diversi comuni della Provincia di Frosinone, della Provincia di Latina e della Provincia di Roma;
- **Regione Puglia** che comprende la Provincia di Foggia l'intero territorio dei comuni di Manfredonia, Lesina, Poggio Imperiale e parte del territorio dei comuni limitrofi;
- **Regione Molise** che comprende della Provincia di Isernia il solo comune di Venafro.

Il Consorzio di Tutela della Mozzarella di Bufala Campana, nato nel 1981, è l'unico organismo riconosciuto dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali per la tutela, la vigilanza, la valorizzazione e la promozione di questo straordinario formaggio del Centro-Sud Italia, apprezzato in tutto il mondo.

Scopo del Consorzio è tutelare la produzione ed il commercio della Mozzarella di Bufala Campana, difendere la denominazione stessa in

Italia e all'estero, favorire il costante miglioramento dei mezzi di produzione della Mozzarella di Bufala Campana ed il conseguente miglioramento qualitativo della sua produzione, esercitare una costante vigilanza sulla produzione e sul commercio ed in particolare sull'uso corretto della sua denominazione di origine.

La Mozzarella di Bufala Campana ha ottenuto nel 1996 la Denominazione di Origine Protetta, il prestigioso marchio europeo con cui vengono istituzionalmente riconosciute quelle caratteristiche organolettiche e merceologiche di questo formaggio, derivate prevalentemente dalle condizioni ambientali e dai metodi tradizionali di lavorazione esistenti nella specifica area di produzione.

1.1 Le origini del bufalo

Il bufalo (*bubalus bubalis*) era presente nel Pleistocene sia in Europa sia nel sud Asia. I cambiamenti di clima che si verificarono in questo periodo confinarono la specie nell'attuale territorio che comprende l'India, l'Indocina e il sud est asiatico, da cui successivamente migrò in Mesopotamia, Europa orientale, Siria ed Egitto. L'origine

dell'allevamento del bufalo in Italia è ancora oggi oggetto di controversie in quanto non è facile desumere, dalla documentazione esistente, se la specie era presente sul nostro territorio prima dell'invasione dei Longobardi. La confusione che esisteva sul termine "*bubalus*" ha portato ad avanzare diverse teorie sull'introduzione del bufalo in Italia. In epoca romana si era, infatti, soliti indicare con il nome di bufali, i buoi selvaggi. Ancora oggi viene fatta molta confusione sul termine inglese "*buffalo*" con cui gli anglosassoni si riferiscono al bisonte, ignorando che essi identificano il nostro bufalo con il termine di "*river buffalo o swamp buffalo*".

Il bufalo appartiene all'ordine degli ungulati, sottordine artiodattili, gruppo ruminanti, famiglia cavicorni, sottofamiglia bovidi, genere *bubalus*; altri generi sono il *bos taurus* ed il *bos indicus*.

I bufali sono molto diversi dai bovini, ma anche tra loro ci sono alcune differenze soprattutto anatomiche che ne giustificano la separazione in due generi con caratteristiche proprie specifiche: il bufalo asiatico, *Bubalus bubalus*, e il bufalo africano, *Bubalus syncerus*.

Anche se tra i due c'è una forte somiglianza fenotipica e lo stesso forte legame per l'acqua, essi non discendono dallo stesso progenitore; vi sono differenze anatomiche che ne giustificano la loro separazione non solo in

differenti generi, Syncerus (Bufalo Africano) e Bubalus (Bufalo Asiatico), ma in differenti gruppi.

E' nel genere Bubalus bubalus, tipo River, che si inquadra la bufala allevata in Italia che fino a pochi anni fa era definita come bufalo di tipo mediterraneo ma che dal 5 Luglio 2000, grazie al Decreto Ministeriale 20/1992, è stata riconosciuta come razza propria denominata "Mediterranea Italiana", traguardo raggiunto grazie al lungo isolamento e alla mancanza di incroci con bufale appartenenti allo stesso gruppo o a gruppi diversi allevati in altri paesi del mondo (Associazione nazionale allevatori bufalini, ANASB).

CAPITOLO I

2. L'ALLEVAMENTO BUFALINO

2.1 Principali problematiche dell'allevamento bufalino

La principale fonte di reddito dell'allevamento bufalino è rappresentata dalla produzione e commercializzazione del latte da destinare alla caseificazione.

Com'è noto la bufala è definita una specie poliestrale tendenzialmente stagionale ('a giorno breve'), essa, infatti, tendenzialmente concentra la propria attività riproduttiva in condizione di luce decrescente, per cui i parti in condizioni naturali si verificano maggiormente nel periodo autunno-inverno. Se, invece, per motivi di mercato, legati alla stagionalità della richiesta di mozzarella, si modifica il calendario degli accoppiamenti, attraverso tecniche riproduttive che consistono

nell'interrompere e ripristinare la promiscuità sessuale in periodi che variano a seconda della richiesta di latte e del grado di stagionalità della mandria, i parti, si verificano maggiormente nel periodo primavera-estate. In ogni caso sia nelle mandrie che non destagionalizzano sia in quelle che destagionalizzano è presente una concentrazione dei parti in determinati periodi dell'anno. Ciò comporta un continuo modificarsi nel corso dei mesi della distanza media dal parto, che nelle mandrie più fertili presenta dei range compresi tra i 90 ed i 210 giorni.

La qualità del latte, intesa come tenore in grasso, proteine (in special modo caseina), acidità titolabile e numero di cellule somatiche, si modifica nel corso dell'anno creando non pochi problemi durante la fase di lavorazione e produzione della mozzarella. Esistono, difatti, periodi in cui la bassa incidenza di caseina sulle proteine totali e l'elevata acidità titolabile (cosiddetto latte di "*figliatelle*" ovvero degli animali che hanno partorito da poco) o l'eccesso di cellule somatiche (azione della plasmina, latte di fine lattazione) comportano problemi nella coagulabilità del latte, nella fase di filatura e modificano la qualità della mozzarella. Queste problematiche, molte volte, si acuiscono se è compromessa anche la qualità igienica del latte o la razione non risulta corretta sia sotto l'aspetto nutrizionale (carenza proteica e/o energetica)

sia per quello igienico (igiene degli alimenti somministrati) (consorzio di tutela MBC, 2008).

2.2 La stabulazione

La bufala oggi vive generalmente confinata in paddock di cemento.

Bisognerebbe evitare condizioni di paddock sporchi e il sovraffollamento delle corsie al fine di garantire idonee condizioni di igiene e profilassi di malattie infettive. Pertanto, risulta di grande importanza la gestione delle deiezioni che devono essere asportate periodicamente.

Nel caso di stabulazione su lettiera è necessario garantire sempre uno strato superficiale asciutto.

Tali presupposti risultano fondamentali per ridurre i casi di infezione della mammella dovuti ai cosiddetti germi ambientali e per contenere la carica microbica mesofila del latte. La penetrazione e la colonizzazione in mammella dei microrganismi, che provengono dall'esterno, sono causa frequente di infezione mammaria (mastite).

In considerazione di ciò è bene ridurre il rischio di entrata dei microrganismi dallo sfintere dei capezzoli, tenendo sotto stretto controllo il microbismo ambientale e l'igiene della lettiera, il cui potere contaminante diminuisce se essa viene migliorata nelle sue caratteristiche e mantenuta asciutta ed esente da muffe; in quelle umide e sporche, non rinnovate di frequente, vivono miliardi di germi ubiquitari ambientali e le occasioni di contagio per la mammella sono molto frequenti.

Si deve evitare, inoltre, di sollevare polvere che favorirebbe la sospensione nell'aria di microrganismi. Tale precauzione serve per tenere basso il rischio di contaminazione del latte da germi indesiderati, specie i clostridi.

Il peggioramento della qualità igienica del latte (aumento della carica microbica), nella specie bufalina, si verifica nei periodi di massima concentrazione dei parti delle primipare e/o nelle giornate caratterizzate da eccessiva piovosità. Le bufale di primo parto richiedono più tempo per abituarsi alle operazioni di mungitura, per cui si è soliti assistere, specialmente nei primi giorni di lattazione, allo stacco del gruppo prendi-capezzoli provocato da un calcio; ciò causa l'aspirazione di aria e/o "altro" cui consegue l'innalzamento della carica microbica. Le anomalie riguardanti l'esecuzione della mungitura ed il funzionamento della

mungitrice meccanica, influenzano fortemente il conteggio delle cellule somatiche in quanto fattori predisponenti l'instaurarsi di nuove infezioni mammarie ed aggravanti la manifestazione clinica di infezioni esistenti. Conseguentemente si alterano tutti i parametri: quantità di latte, grasso, proteine (con alterazione del rapporto caseine/proteine totali), lattosio e residuo secco magro (Zecconi, 2002).

Anche le modalità di somministrazione degli alimenti possono causare inquinamento del latte. La pratica di somministrare parte dei concentrati durante la mungitura può essere la causa, in numerose occasioni, della contaminazione della sala e quindi del latte. La suddetta pratica è responsabile della liberazione di polveri che, in un ambiente umido quale la sala di mungitura, favoriscono la crescita e lo sviluppo di lieviti e muffe che possono colonizzare il latte. La loro proliferazione può, inoltre, essere favorita da latte caratterizzato da basse cariche microbiche. I lieviti, com'è noto, sono responsabili di alcuni difetti della mozzarella (gonfiore tardivo) e riducono la vita commerciale del prodotto; mentre le muffe, attraverso la produzione delle aflatossine, sono dannose per la salute dell'uomo (consorzio di tutela MBC, 2008).

2.3 Qualità del latte

Il latte di bufala ha sapore dolce, colore bianco opaco dovuto all'assenza di carotenoidi. Il pH oscilla tra il 6,6-6,8. Il grasso è tra il 5,5-13% con prevalenza dell'acido oleico tra gli acidi insaturi e dell'acido palmitico tra gli acidi saturi. Le sostanze azotate, normalmente, variano dal 4,4 al 4,6%, ma talvolta superano questo valore. Il lattosio varia tra il 4,5 e il 5%.

Le principali differenze di natura chimica e chimico-fisica tra il latte bufalino e quello vaccino sono rappresentate dal contenuto in grasso e in proteine, parametri, questi, fondamentali per la caseificazione. Essi risultano pari, mediamente, all'8,16% e 4,67% nel latte bufalino e al 3,3% e 2,7% nel latte vaccino rispettivamente.

Questi diversi valori contribuiscono senz'altro alla tipicità del prodotto grazie alla diversa consistenza che esso viene, alla fine, ad assumere, e conferiscono, inoltre, una maggiore resa alla trasformazione. Infatti, con latte fresco di bufala con l'8,3% di grasso e il 4,3% di proteine si ottiene una resa media del 24,6%. Ossia dalla lavorazione di 1 quintale di latte di bufala si ottengono oltre 24 Kg di mozzarella, contro i 13 Kg ottenuti

mediamente da un quintale di latte vaccino. La resa del latte di bufala risulta, in questo caso, superiore di circa 1,8 volte quella del latte bovino. I due tipi di latte presentano, tra l'altro, anche una diversa composizione caseinica che consente tramite analisi di individuare una frode molto comune: la presenza di latte vaccino nel prodotto venduto come mozzarella integrale di bufala.

Altro aspetto della tipicità di questo prodotto è strettamente legato alla natura microbiologica del latte. Particolare importanza assume infatti la composizione della microflora lattica.

In condizioni normali, nel latte di bufala sono presenti alcuni ceppi di lattobacilli in concentrazioni superiori a quelle contenute nel latte vaccino. Dall'attività metabolica di questi bacilli risulterebbe, per la maggior parte, il sapore e l'aroma tipici di questo formaggio, attraverso la produzione di particolari sostanze e composti. Sembra inoltre influire notevolmente sul fenomeno di acidificazione della cagliata durante la trasformazione (Bianchi et al, 1985).

2.4 Le variazioni delle caratteristiche qualitative del latte di bufala

Il continuo modificarsi della distanza media dal parto dei soggetti in lattazione nel corso dell'anno risulta responsabile dell'elevata variabilità del tenore in grasso e proteine del latte di bufala. Il latte di massa che si produce nei mesi a più alta incidenza di parti risente della composizione chimica del latte delle bufale partorite da poche settimane; infatti, in questo periodo, l'incidenza del latte delle "fresche" può incidere fino al 60% su quello di massa. Ciò comporta un aumento dell'acidità titolabile e difficoltà nella caseificazione del latte con produzioni di mozzarelle che presentano una durata commerciale minore e peggioramento delle caratteristiche organolettiche del formaggio (consorzio di tutela MBC, 2008). Ad inizio lattazione, infatti, l'acidità titolabile del latte di bufala risulta superiore a 12 °SH (gradi Soxhlet-Henkel, riferiti a 100 ml di latte), per abbassarsi a circa 10 a due settimane e permanere a valori superiori a 9 fino a 25 giorni, a fronte di un valore normale che risulta essere di circa 8 (consorzio di tutela MBC, 2008).

Nella fase iniziale della lattazione, errori di razionamento (carenza energetica, carenza proteica, eccessi di insilato, ecc.) possono

amplificare il fenomeno in seguito ad un eccessivo ricorso alle riserve endogene ed ad un conseguente aumento degli acidi organici che si sviluppano.

L'origine tropicale della specie bufalina, la poca adattabilità alle basse temperature e specialmente alle notevoli escursioni termiche, acuite dall'esposizione ai venti freddi e da stalle che non garantiscono una buona termoregolazione dei soggetti, possono essere causa di aumento dell'acidità titolabile particolarmente nei passaggi da periodi caldi a periodi freddi (consorzio di tutela MBC, 2008). Questo fenomeno è frequentemente osservato nei primi mesi dell'anno anche nei soggetti a metà ed a fine lattazione. La risoluzione di questa problematica risulta, pertanto, alquanto complessa ed è fondamentale analizzare e valutare le diverse cause che possono indurre l'incremento dell'acidità titolabile prima di adottare le opportune soluzioni.

In presenza di latte con acidità titolabile elevata risulta fondamentale valutare (consorzio di tutela MBC, 2008):

- a) carica microbica mesofila;
- b) caratteristiche chimiche della dieta somministrata;
- c) caratteristiche nutrizionali ed igienico-sanitarie degli alimenti che compongono la razione.

La cattiva conservazione del latte munto (elevate temperature di stoccaggio, frigoriferi non disinfettati, ecc.), il non idoneo trasporto in caseificio (cisterna o bidoni non opportunamente detersi) o la mancata igiene durante le operazioni di mungitura favoriscono l'innalzamento della carica microbica saprofiti. Quest'ultima, fermentando il lattosio, produce acido lattico responsabile dell'innalzamento dell'acidità (consorzio di tutela MBC, 2008).

Inquinamenti del latte sono facili a verificarsi nelle stalle che non dispongono di una idonea presala dove far sostare le bufale prima della mungitura o di un idoneo sistema di lavaggio della mammella e, nei casi in cui la densità di bestiame allevata in stalla è particolarmente elevata, di tutte le regioni ventrali dell'animale (consorzio di tutela MBC, 2008).

L'incremento dell'acidità titolabile può verificarsi o ampliarsi se vengono somministrate razioni non idonee sia sotto il profilo nutrizionale che sotto quello igienico-sanitario, in seguito all'incremento degli acidi prodotti a livello ruminale o a quelli endogeni che si liberano per un'intensa lipomobilizzazione (consorzio di tutela MBC, 2008).

Le cause alimentari responsabili dell'incremento dell'acidità titolabile del latte di bufala possono essere sintetizzate nei seguenti punti (consorzio di tutela MBC, 2008):

- a) eccessive quantità di insilati senza l'impiego di tamponi che agiscono a livello ruminale e/o intestinale;
- b) eccesso di foraggi grossolani (fieno, paglia), specialmente se non si conosce la composizione chimica e si sopravvalutano le caratteristiche nutrizionali;
- c) riduzione eccessiva della quota di foraggi della razione (razioni con rapporto foraggio:concentrato < 40:60);
- d) basse concentrazioni proteiche ed energetiche della razione.

Relativamente al primo punto la somministrazione di eccessivi quantitativi di insilati (oltre 8 kg di sostanza secca), che possono rappresentare circa il 60% della sostanza secca dell'intera razione, comporta un'ingestione di circa 1,5 kg di acidi organici, che se non prontamente tamponati dall'organismo, possono causare acidosi metabolica ed innalzamento dell'acidità titolabile del latte.

Un'amplificazione del fenomeno si verifica se l'eccesso di insilati (principalmente silomais) risulta associato ad una elevata riduzione della lunghezza della fibra derivante dai foraggi componenti la razione; ciò causa, infatti, una riduzione della produzione di saliva che, com'è noto, è un efficace tampone. Il fenomeno si acuisce quando la dieta risulta caratterizzata da una eccessiva fermentescibilità sia per presenza di particolari alimenti (cereali, melasso, ecc.), sia per riduzione della quota

di foraggi nella razione delle bufale in lattazione (punto c); anche in questo caso la riduzione della salivazione e l'incremento degli acidi organici in circolo possono essere responsabili dell'incremento di acidi organici nel latte che peggiorano la sua caseificabilità.

L'eccesso di insilati con cattive caratteristiche igieniche e nutrizionali può anch'esso, con meccanismi diversi, causare un peggioramento della qualità del latte ed un aumento dell'acidità titolabile. Le elevate quantità di azoto solubile ed ammoniacale, considerati come proteine grezze quando si analizza la sola composizione chimica della sostanza secca, falsano il valore nutritivo dell'alimento sia sotto l'aspetto proteico che sotto quello energetico. I ruminanti, in genere, e la bufala in particolare, necessitano, in questo caso, per organizzare l'azoto solubile e quello ammoniacale a proteine batteriche, di una maggiore quota di energia, specialmente se prontamente utilizzabile dai batteri ruminali. Un non corretto rapporto NSC/PG della dieta comporta uno spreco di parte dell'energia somministrata per la trasformazione dell'ammoniaca in urea. Questa energia, non essendo utilizzata, potrà, in determinate fasi produttive, aumentare il bilancio energetico negativo che, incrementando la lipomobilizzazione e riducendo la sintesi mammaria di lipidi e proteine per carenza di substrato, peggiorerà le caratteristiche qualitative del latte e la resa al caseificio. Analogο riscontro si verifica allorquando

le diete non soddisfano le esigenze proteiche ed energetiche (punto d) o quando si sopravvalutano alimenti particolarmente fibrosi (punto b) che, notoriamente, riducono l'assunzione di sostanza secca e, quindi, di nutrienti.

L'identificazione di partite di latte ipoacido (6 - 6,7 °SH), che di solito presentano tenori proteici inferiori al 4% (molto raro nella bufala), risulta utile sia all'azienda, che in tal modo può correggere la dieta ricavandone anche benefici sotto l'aspetto quanti-qualitativo, sia al caseificio che deve modulare quantità di caglio, di fermenti ed, eventualmente, aggiungere cloruro di calcio o associare opportunamente latte di partite diverse, per ottimizzare il processo di caseificazione (consorzio di tutela MBC, 2008).

Quest'ultima soluzione è quella che si preferisce allorché la vera causa del latte ipoacido non viene identificata.

È opportuno ricordare che il latte può risultare ipoacido anche in soggetti, e quindi in mandrie, a fine lattazione pur in presenza di un tenore proteico elevato (4,7 - 5,2%).

Partite di latte di aziende destagionalizzate, in cui si verifica un ritardo dei parti ad inizio anno, possono presentare, pertanto, gli stessi difetti di quelle prodotte da soggetti appartenenti a mandrie con distanza dal parto inferiore a 100 giorni ed il cui latte è caratterizzato da un basso tenore

proteico. Indipendentemente da altri fattori e a parità di distanza dal parto, d'estate l'acidità titolabile tende ad abbassarsi leggermente nelle partite con carica microbica bassa ma si innalza in quelle con carica microbica alta.

Il tenore lipidico del latte, destinato alla trasformazione in “Mozzarella di Bufala Campana - DOP” (MBC), non deve risultare inferiore al 7,2%; esso dipende, oltre che da fattori genetici e dalla distanza dal parto anche in buona parte dalle caratteristiche della dieta somministrata alle bufale in lattazione.

Il rapporto foraggio:concentrato normalmente utilizzato nelle diete per bufale, generalmente garantisce la quota di pareti cellulari (NDF) utile ad una buona funzionalità ruminale, per cui l'abbassamento del tenore lipidico difficilmente dipende dalla bassa quantità di fibra somministrata agli animali. Più frequentemente è la carenza energetica e lo scarso utilizzo di concentrati a causare un abbassamento del grasso nel latte (consorzio di tutela MBC, 2008).

Dai dati dell'ANASB e da prove sperimentali è emerso che il latte di bufale sottoposte a singola mungitura presenta un tenore lipidico più basso (7,8%) rispetto a quelle munte due volte al giorno (8,4%). La suddetta differenza dipende dal fatto che, in moltissime aziende, il concentrato viene distribuito in sala di mungitura e, di conseguenza,

viene assunto in minore quantità dalle bufale sottoposte ad una sola mungitura giornaliera. Ne consegue che la dieta di queste ultime risulta caratterizzata da un rapporto foraggio:concentrato più alto rispetto a quella assunta da bufale sottoposte a doppia mungitura.

È stato evidenziato che in molti casi la riduzione dell'apporto di nutrienti, non soddisfacendo appieno i fabbisogni di produzione, ha influenzato negativamente la quantità del latte prodotto, ma non ne ha modificato le caratteristiche qualitative. Ciò fa supporre che nella bufala, specie non ancora *ad habitus* lattifero, in caso di carenza dei nutrienti viene penalizzata la produzione di latte piuttosto che la composizione chimica. Ricordiamo che, secondo esperienze di campo, quando per fattori di origine alimentare la quantità di latte diminuisce, mentre la sua composizione chimica oscilla entro limiti da ritenersi soddisfacenti (qualche segnale è rappresentato da alterazioni della crioscopia e dell'acidità titolabile), di solito viene penalizzata la resa al caseificio (consorzio di tutela MBC, 2008).

3. CENNI DI ANATOMIA E FISIOLOGIA DELLA GHIANDOLA MAMMARIA NELLA BUFALA

3.1 Anatomia della mammella

La ghiandola mammaria è un organo costituito da tessuto secretorio, da connettivo e da adipe. La ghiandola propriamente detta è composta da cellule che attingono dal sangue gli elementi essenziali per la sintesi del latte. Lo sviluppo della ghiandola mammaria segue tappe ben precise, già a livello embrionale esistono rudimenti riconducibili ad una mammella. Nei ruminanti, essa origina da due linee ectodermiche ispessite che si estendono dalla regione toracica a quella addominale; questi cordoni mostrano degli addensamenti cellulari sferoidali, le *gemme mammarie*, da cui origineranno gli alveoli mammari e si differenzieranno le strutture definitive della ghiandola (Aguggini et al,1992).

L'anatomia della ghiandola mammaria si differenzia molto tra specie diverse. Il numero di ghiandole e capezzoli non è lo stesso per la vacca,

bufala, scrofa e cavalla. Tuttavia, l'anatomia microscopica è molto simile tra le specie. La mammella del bufalo è un grande organo con un peso di circa 50 kg (compreso latte e sangue) (Sandholm et al, 1995). Pertanto, quest'organo deve essere molto ben attaccato allo scheletro e ai muscoli. I legamenti mediani sono composti da tessuto fibroso elastico, mentre i legamenti laterali sono composti da tessuto connettivo con minore elasticità. Un indebolimento dei legamenti mediani delle mammelle porterà ad avere i capezzoli orientati verso l'esterno e di conseguenza, a rendere la mammella meno adatta alla mungitura meccanica (Figura 2).

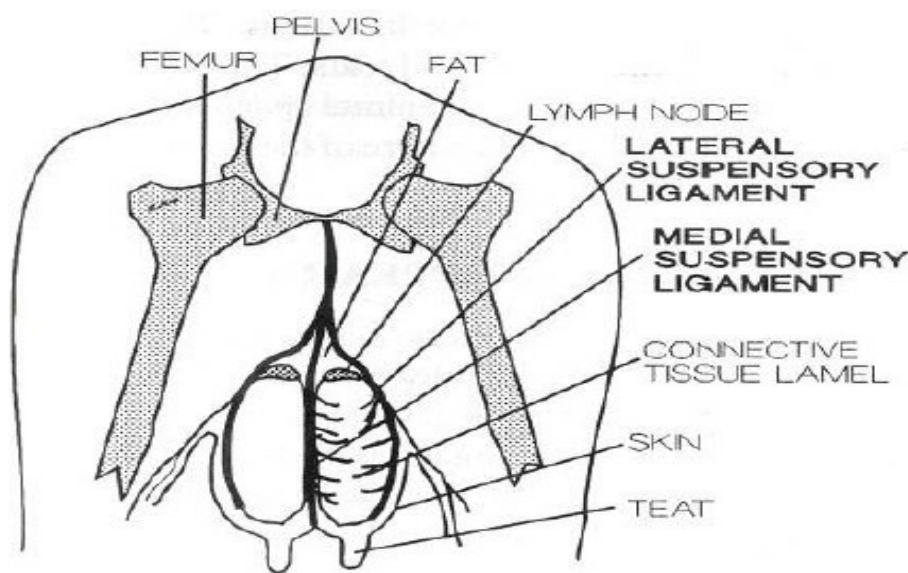


Figura 2. Struttura dei legamenti della mammella (Tanhuanpää, E. 1995)

Lo sviluppo della ghiandola mammaria inizia presto nella vita fetale. Già nel secondo mese di gestazione si avvia la formazione del capezzolo e lo

sviluppo continua fino al sesto mese di gestazione. Quando il feto è di sei mesi, la mammella è quasi completamente sviluppata con le quattro ghiandole separate da un legamento mediano, il capezzolo e le cisterne della ghiandola. Lo sviluppo dei dotti che secernono il latte si avrà tra la pubertà e il parto (Purohit et al, 2014).

La mammella continua l'accrescimento sia delle dimensioni che del numero delle cellule durante le prime lattazioni, apportando un aumento anche della capacità di produzione di latte.

La ghiandola mammaria del bufalo è costituita da quattro strutture ghiandolari separate, ciascuna terminante con un capezzolo (Tanhuanpää, 1995).

Il latte che viene sintetizzato in una ghiandola non può passare nelle altre ghiandole. I quarti posteriori delle mammelle sono leggermente più grandi di quelli anteriori e contengono più latte. Il rapporto è di circa 60:40 (posteriore:anteriore). Ci vuole più tempo per mungere i quarti posteriori.

La ghiandola mammaria è costituita da tessuto connettivo e tessuto secernente. La quantità di tessuto secernente o il numero di cellule che secernono, è un fattore limitante per la capacità della mammella di produrre latte. Il tessuto spugnoso (parenchima) che secerne il latte è composto da milioni di piccole e complesse ramificazioni (alveoli).

L'interno di ogni alveolo è rivestito da un singolo strato di cellule epiteliali secernenti, avvolte da cellule mioepiteliali (o a canestro) che, contraendosi in seguito al riflesso di eiezione lattea, permettono al latte di defluire dai corti dotti alveolari ai più grandi dotti galattofori, fino a raggiungere la cisterna del latte per poi incanalarsi in essa e infine nel canale del capezzolo.

Le cellule epiteliali alveolari presentano la capacità di convertire i precursori assorbiti dal sangue in costituenti del latte.

La ghiandola mammaria è densamente innervata soprattutto a livello del capezzolo. La pelle del capezzolo è provvista di nervi sensoriali sensibili alla suzione eseguita dal vitello e pertanto influenzata dalla pressione, calore e frequenza di suzione; inoltre la ghiandola mammaria è molto ben supportata da vasi sanguigni, arterie e vene. La funzione primaria del sistema arterioso è quella di fornire un approvvigionamento continuo di sostanze nutritive alle cellule per la sintesi del latte. La mammella contiene anche un sistema linfatico, che gioca un ruolo fondamentale di allontanamento dei prodotti di scarto dalla mammella stessa.

La relazione tra la struttura della mammella e dei capezzoli delle bufale con l'eiezione lattea non è stata ancora chiarita del tutto. Nelle bufale si ha una variazione della forma della mammella rispetto alle vacche da latte, perché la maggior parte delle bufale non è allevata secondo

selezione. Le diverse forme della mammella possono essere classificate in arrotondata, a scodella e a coppa. A tal proposito, sono stati condotti studi sulle variazioni morfologiche (forme e dimensioni) della mammella e dei capezzoli e la loro relazione con la produzione di latte.

Uno studio eseguito su 200 bufale Murrah ha dimostrato che tra le diverse forme della mammella, la forma a scodella era molto comune, seguita dalle forme globulare, pendule e forme caprine e la prevalenza era rispettivamente del 61,0%, 17,0%, 13,0% e 9,0%. Allo stesso modo, è stato dimostrato che, i capezzoli di forma cilindrica erano più frequenti con una percentuale di 52,5 seguita da una forma a pera, a bottiglia, conica e a imbuto con 18,0; 11,0; 10,5 e 8,0% rispettivamente. Sono stati presi in considerazione anche i valori medi della lunghezza, larghezza e profondità delle mammelle di diversa forma. Le bufale sono state munte due volte al giorno, vale a dire, mattina e sera alle 4.00 e alle 16.00 rispettivamente e sono state stimolate per la fuoriuscita del latte, o attraverso la suzione del vitello o massaggiando manualmente la mammella previo lavaggio. Le misurazioni fisiche prendevano in considerazione lunghezza, larghezza e profondità della mammella, mentre le misurazioni effettuate sui capezzoli erano lunghezza del capezzolo, diametro, distanza tra i capezzoli anteriori, distanza tra i capezzoli posteriori e la distanza tra anteriori e posteriori. E' emerso che

la resa media giornaliera di latte di bufala con capezzoli di forma cilindrica è stata maggiore seguita dalla forma a bottiglia, imbuto, pera e conica. (Prasad et al, 2010) e lo stesso è stato segnalato da Bharadwaj et al, (2007).

Anche la forma a scodella della mammella è più favorita rispetto alle altre forme in quanto facilita l'estensione in avanti e indietro, piuttosto che verso il basso (Sastry e Tripathi, 1988). In realtà, i vantaggi concreti che potrebbero essere ottenuti mettendo a confronto la struttura anatomica della mammella e del capezzolo e l'eiezione latte non sono stati ancora ben valutati.

Caratteristiche della mammella e dei capezzoli e loro misure potrebbero essere utilizzati come criteri affidabili nella scelta di bufale per la produzione di latte come è stato anche opinato da Lin et al, 1987, e Gajbhiye et al, 2007, ai fini di poter applicare criteri affidabili per la selezione di animali con maggiori performance di produzione di latte. Ci sono pochi dati sulle altre razze bufaline del Pakistan, Italia ed Egitto pubblicati su questo argomento.

Nel confronto bufala/vacca, le bufale hanno più lunghi e spessi capezzoli con canali del capezzolo più lunghi rispetto a quelli delle vacche, aspetto da considerare quando si esegue la mungitura meccanizzata (Bhosrekar e Nagpaul, 1971; Sastry et al, 1988; Saxena, 1973; Thomas et al, 2004,).

Le misurazioni eseguite sulla razza Bufalina Mediterranea hanno rilevato lunghezze dei capezzoli da 6,3 a 8,5 cm (Borghese et al, 2007). In un recente studio anatomico comparativo tra animali macellati bovini e bufalini egiziani, è stato riscontrato che il canale del capezzolo era dal 30 al 40% più lungo nelle bufale rispetto alle vacche frisone (El-Ghousien et al, 2002).

Il canale del capezzolo più lungo ed uno sfintere del canale del capezzolo più robusto (Uppal et al, 1994) sono uno dei motivi di una minore incidenza di mastiti nelle bufale rispetto alle vacche (Sastry et al, 1988; Singh e Singh, 1993).

L'anatomia e la fisiologia della mammella di bufala sono abbastanza primitive rispetto a quelle delle vacche da latte. Quando una bufala viene munta con la macchina per la prima volta, è importante garantire che la mammella venga svuotata in modo efficiente. È noto che anche nelle vacche da latte l'espulsione è inibita o alterata quando vengono munte in ambiente non familiare e allora è possibile solo estrarre il latte cisternale (Bruckmaier et al, 1993). Il ripetersi dell' inibizione dell'eiezione latte può comportare una riduzione dell'attività secretoria della ghiandola mammaria.

In studi precedenti eseguiti su bufali di diverse razze e stadi di lattazione, è stato osservato che non vi era nessuna frazione cisternale di latte e in

assenza di questa i capezzoli sono vuoti (Aliev, 1969). Di conseguenza i capezzoli bufalini potrebbero essere paragonabili a capezzoli di animali da latte verso la fine della mungitura.

Il latte nella mammella di una vacca da latte è per lo più circa l'80% memorizzato nel compartimento alveolare e solo circa il 20% è presente nella cisterna. Al contrario, nei piccoli ruminanti, come pecore e capre, la frazione cisternale ammonta a oltre il 50% (Bruckmaier e Blum, 1992), mentre i bufali hanno piccole cisterne in grado di contenere solo circa il 5% del latte totale (Thomas et al, 2004). La frazione di latte cisternale è disponibile alla macchina mungitrice o al vitello da latte prima dell'eventuale eiezione del latte. Il latte alveolare, tuttavia, è disponibile solo se espulso attivamente. L'espulsione è indotta dall'ossitocina, che viene rilasciata dall'ipofisi in risposta a stimolazioni tattili o meccaniche del capezzolo. In casi in cui il rilascio dell'ossitocina è totalmente carente o ridotto, l'eiezione del latte è inibita, con conseguente perdita della produzione. Durante la mungitura, una cisterna vuota può portare a difficoltà nella rimozione del latte. Pertanto, il verificarsi dell'eiezione latte prima che la cisterna sia vuota è importante, tenendo conto delle dimensioni limitate della cisterna, un'adeguata preparazione della mammella nelle vacche è più importante rispetto ai piccoli ruminanti. Contemporaneamente, la rimozione completa del latte alveolare ad ogni

suzione o mungitura, che viene raggiunta solo con la completa espulsione di latte, è un prerequisito per mantenere un elevato livello di sintesi e secrezione del latte durante tutta la lattazione. Infine, il latte che rimane nella mammella aumenta il rischio di infezione mammaria, perché il latte residuo rappresenta un substrato ottimale per i microrganismi nella ghiandola mammaria con conseguente perdita della produzione. (Bruckmaier e Wellnitz, 2014).

Nei bufali, come nelle vacche, la frazione cisternale del latte dipende principalmente dalle caratteristiche anatomiche, legate ad esempio alla cavità cisternale (del capezzolo e della ghiandola) e alle dimensioni del tessuto alveolare. Nei bufali la maggior parte del latte cisternale è immagazzinato nell'area cisternale del capezzolo, che è la parte principale della cavità cisternale totale (Thomas et al, 2004). Nei bufali, poiché la maggior parte del latte è la frazione alveolare, è logico che questo latte viene rimosso completamente, attraverso l'eiezione latte ed un'efficiente mungitura.

Come riportato per le vacche, nei bufali le cisterne sono più grandi nelle prime fasi di lattazione rispetto a metà e fine fase lattazione, a causa della pressione intramammaria. Analogamente, le aree cisternali risultano più grandi nei bufali più anziani, a causa degli effetti di

cedimento che si hanno in quest'ultimi (Bruckmaier e Blum, 1992;. Bruckmaier et al, 1994b; Bruckmaier e Hilger, 2001).

L'aumento della frequenza di mungitura, da due a tre volte al giorno, causa un aumento del 9-10% della produzione di latte nelle bufale (Dash et al, 1976. Ludri, 1985).

Nella vacca la mungitura eseguita tre volte al giorno aumenta la produzione di latte di circa il 10-15% (Henderson et al, 1983). Vacche con piccoli volumi cisternali rispondono meglio alla mungitura eseguita tre volte al giorno rispetto alle vacche con grandi serbatoi cisternali (Dewhurst e Knight, 1994). Dal momento che i bufali hanno piccole cisterne, essi sono probabilmente più adatti alla rimozione del latte frequentemente, invece di eseguire la mungitura due volte al giorno soltanto.

E 'stato ipotizzato che ci potrebbe essere un ulteriore selezione mirata alle capacità di stoccaggio della cisterna mammaria dei bovini da latte. In alcune parti del mondo come l'Europa, dove predominano allevamenti intensivi, saranno selezionati animali adatti a più frequenti mungiture. In altre parti del mondo come l'Australia e la Nuova Zelanda, dove i bovini sono allevati su pascoli, saranno selezionati per le più grandi capacità di stoccaggio della mammella e quindi, intervalli di mungitura più lunghi (Knight, 2001). Anche se i bufali in India sono stati selezionati per le

caratteristiche di mungitura, la selezione non ha tenuto conto della mungitrice meccanica. Oltre a tutto questo, l'applicazione limitata di tecniche di allevamento avanzate, come l'inseminazione artificiale, ha rallentato il processo di miglioramento genetico in questa specie (Sastry, 1983).

3.2 Fisiologia della mammella

La fisiologia della mammella della bufala differisce leggermente dalla bovina. Si dice che i bufali siano difficili da mungere a causa del lento riflesso di eiezione del latte e del loro sfintere del capezzolo duro. Il riflesso dell'eiezione del latte sembra essere in parte ereditato, ma è anche in parte legato all'ambiente (Hogberg e Lind, 2003). Il latte conservato nelle cisterne e nei grandi dotti può essere rimosso prima del riflesso che stimola l'espulsione del latte, ma il latte accumulato all'interno degli alveoli e piccoli dotti non può essere rilasciato o espulso perché caratterizzato da un rapido aumento della pressione intramammaria. Questa espulsione è causata dalla contrazione delle

cellule mioepiteliali che circondano gli alveoli, che indirettamente rispondono agli stimoli associati alla mungitura.

Gli stimoli delle operazioni di massaggio attivano recettori nervosi della pelle dei capezzoli. Gli impulsi ricevuti mediante questi recettori vengono trasmessi attraverso le innervazioni alla colonna vertebrale e fino al cervello, terminando al nervo sopraottico e ai nuclei paraventricolari dell'ipotalamo. Normalmente l'emissione del latte avviene entro 2-3 minuti dopo la prestimolazione manuale, ma può accadere anche dopo 10 minuti con il rilascio concomitante di ossitocina, prolattina e cortisolo.

La pressione intramammaria aumenta all'inizio della mungitura, e scende a circa 1-2 kPa alla fine della mungitura. L'alta pressione endomammaria contribuisce alla fuoriuscita del latte (Hogberg e Lind, 2003). La pressione è più alta nelle bufale durante la mungitura che nelle bovine. La pressione intramammaria varia tra gli individui e le mungiture, ma il suo livello non è sempre indicativo di un'elevata produzione di latte. Il tempo di eiezione del latte è più breve nella fase iniziale e fino a metà lattazione rispetto allo stadio finale della lattazione. Stessa condizione si osserva quando la produzione è più alta. Se i bufali sono accuratamente selezionati per la resa, il miglioramento di queste caratteristiche è possibile (Borghese, 2007).

3.3 Il ruolo dell'ossitocina

Il principale responsabile del riflesso dell'eiezione lattea è l'ossitocina, prodotta nell'ipotalamo a livello del sistema nervoso centrale. In conseguenza dell'eccitazione di appositi recettori che si trovano nel capezzolo, si diparte un impulso nervoso che raggiunge l'ipotalamo e fa sì che l'ossitocina venga rilasciata nel circolo sanguigno per raggiungere in circa un minuto la mammella dove si lega a specifici recettori delle cellule mioepiteliali causandone la contrazione e quindi la fuoriuscita del latte (Thomas et al, 2005).

Affinché l'ossitocina agisca correttamente, è importante anche il riflesso del condizionamento, il quale va a compromettere la risposta produttiva dell'animale. Per una corretta ed efficiente emissione di latte, la bufala deve trovarsi in un ambiente confortevole e tranquillo, per tale ragione occorre evitare tutto ciò che potrebbe influire negativamente sull'animale, soprattutto non bisogna spaventarlo o maltrattarlo in altro modo. Nelle bufale da latte il riflesso può essere condizionato da diversi fattori, come la stimolazione del capezzolo, la presenza del piccolo o il rumore dell'attivazione della macchina mungitrice.

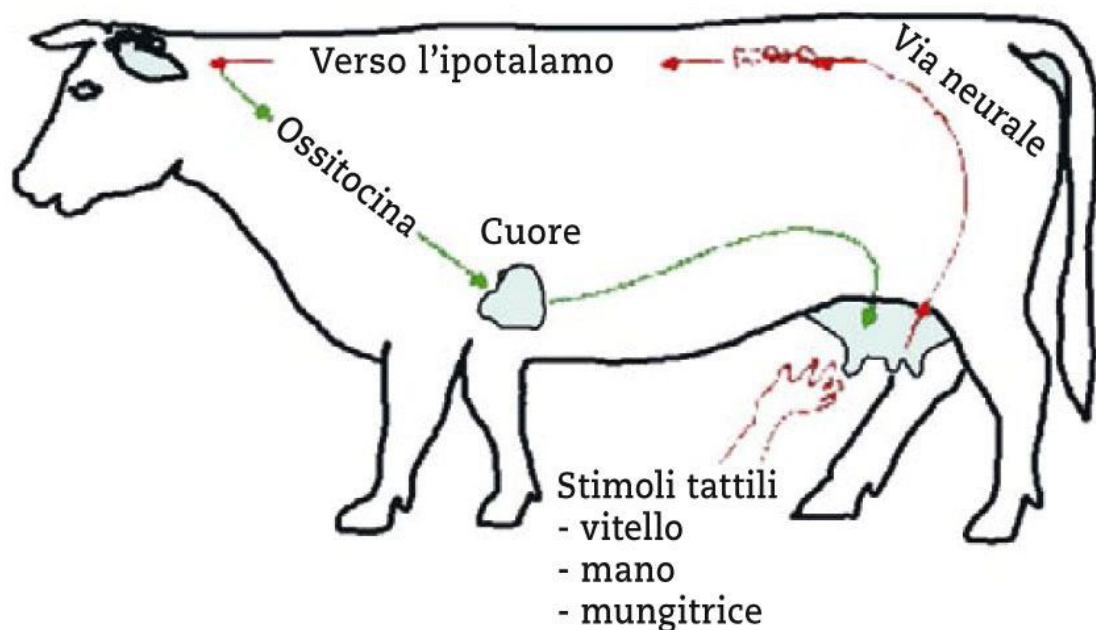


Figura 3. Il riflesso neuroendocrino che porta all'eiezione del latte
(L'informatore Agrario, 2006)

Diversi tipi di stimolazione tattile della ghiandola mammaria causano diverse risposte dell'ossitocina. La suzione ha dimostrato più volte di essere lo stimolo più potente. La mungitura manuale induce un rilascio più pronunciato di ossitocina rispetto alla macchina mungitrice, migliora lo svuotamento delle mammelle e riduce la quantità di latte residuo. Il rilascio di ossitocina è anche attivato da stimoli visivi o acustici, come la vista del mungitore, il rumore della pompa a vuoto o quando si entra in sala mungitura. L'animale viene indotto a rilasciare il latte mettendo a punto un riflesso condizionato. Il livello basale di concentrazione di ossitocina è 4,8-6,7 ng/L. Il picco di concentrazione può essere alto

come 90 ng/L ma il livello normale durante la stimolazione del capezzolo o durante la mungitura è di circa 30 ng/L. Questa azione fisiologica è legata al tempo di mungitura e ai continui stimoli dei nervi afferenti. L'eiezione del latte nelle bufale senza pre-stimolazione potrebbe essere ritardata dai 3 ai 7 min.

Iniezioni di ossitocina vengono utilizzate spesso in grandi mandrie di bufali per stimolare la fuoriuscita del latte. Gli svantaggi sono che il trattamento continuo con l'ossitocina potrebbe portare a una dipendenza progressiva e a mancata risposta ai normali stimoli di emissione del latte (Thomas et al, 2005).

3.4 Sinergismo ambiente/ormone

I bufali sono particolarmente sensibili ai cambiamenti dell'ambiente, essi possono trattenere il latte se sono a disagio. Se gli animali sono stressati, spaventati o doloranti, viene secreta l'adrenalina. Questo ormone provoca costrizione dei vasi sanguigni, ostacolando così la distribuzione di una quantità di ossitocina sufficiente alla mammella. L'adrenalina inoltre agisce direttamente sulle cellule mioepiteliali negli alveoli bloccando i

recettori dell'ossitocina. L'inibizione della discesa di latte porterà alla stasi del latte nel tessuto secretorio della mammella.

L'inibizione centrale del latte di eiezione può essere totalmente abolita dall'ossitocina esogena in quantità fisiologiche.

L'esposizione continua a stress influenza negativamente la produzione di latte nelle bufale. Cambio di mungitore o applicazione di tecniche di mungitura sbagliate o mungitrici in cattive condizioni sono alcuni dei motivi di arresto dell'eiezione del latte nel bufalo. Si è verificata l'eiezione precoce del latte con rilascio simultaneo di ossitocina, prolattina e cortisolo in bufale in cui veniva somministrata alimentazione ed eseguita una prestimolazione prima dell'attacco della macchina mungitrice. In mancanza di un'adeguata stimolazione, l'eiezione del latte può essere facilmente inibita. È importante, dunque, fornire un buon protocollo di prestimolazione per indurre l'emissione del latte nelle bufale e migliorare così le prestazioni di mungitura (Hogberg e Lind, 2003). Tuttavia, a causa della quantità ridotta di latte presente nella mammella a fine lattazione, sarebbe opportuno eseguire ancor di più in questa fase una stimolazione pre-mungitura. Vi è anche un altro meccanismo che regola la produzione di latte, ovvero quello che vede la partecipazione di una proteina, il fattore di inibizione della lattazione (FIL), sintetizzata dalle cellule secretorie che ha un'azione inibitoria sulle

stesse cellule limitando ulteriormente la secrezione lattea. FIL è attiva soltanto negli alveoli, in contatto con le cellule secretorie, e il suo effetto è dipendente dalla concentrazione. L'eccesso di latte residuo dovuto all'espulsione incompleta del latte aumenta la concentrazione di FIL negli alveoli e diminuisce la secrezione lattea. Tuttavia, la distribuzione del latte fra cisterna e compartimento alveolare può influenzare il grado di inibizione del feedback. (Costa e Reinemann, 2004).

4. CENNI SULLA PRATICA DELLA MUNGITURA NELLA BUFALA E SULLE PROBLEMATICHE AD ESSA CORRELATE

4.1 Gli impianti e la sala di mungitura

Le bufale allevate vengono munte utilizzando sistemi di mungitura meccanizzati tutelati da norme internazionali (ISO 5707, 2007). In India e in Pakistan, dove si trovano oltre il 90% di bufali di tutto il mondo, è effettuata una produzione basata principalmente su un allevamento di tipo familiare. In questi paesi pertanto spesso le pratiche, come la mungitura, l'alimentazione e la riproduzione non si basano su principi scientifici bensì empirici. Nella maggior parte delle aziende agricole le bufale vengono munte due volte al giorno, utilizzando tale fase anche per somministrare alimenti in maniera individuale (Varma e Sastry, 1994).

L'ANASB (Associazione Nazionale Allevatori Specie Bufalina) riferisce (2007), sulla base delle informazioni fornite dai produttori e rivenditori, che l'Italia ha circa 3.000 impianti di mungitura di vario tipo, tra cui anche un impianto robotizzato. Ricontriamo maggiormente le sale a

spina di pesce (60%), e le sale a tandem (20%). Un'azienda media ha circa 120 bufale adulte e due mungitori. I bufali sono animali forti e spesso è necessario rafforzare le strutture e aumentare le dimensioni dei diversi componenti della sala.

Esistono diversi tipi di impianti di mungitura: *a spina di pesce*, *a tandem*, *a pettine*, *a giostra* e *il robot*. Ognuno di essi ha caratteristiche diverse: il primo, che è anche il più diffuso, è caratterizzato da una mungitura di tipo collettivo e permette di ridurre al massimo i tempi di lavoro, grazie all'introduzione degli animali a gruppi e alla riduzione dei movimenti dell'operatore. Le bufale si dispongono una affianco all'altra occupando così uno spazio minore. Nelle sale *a spina di pesce* un operatore può seguire contemporaneamente 15-16 capi in mungitura o anche 19-20, se l'impianto è dotato di distacco automatico dei gruppi prendicapezzoli e se le mammelle sono molto pulite. Non sono previsti divisori fra una bufala e l'altra e gli animali, quindi, sono fisicamente in contatto; questo fatto può causare problemi nell'occupazione quando il numero di capi entrati sia inferiore al numero delle poste stesse, come spesso accade alla fine della mungitura.

Le sale con impianti *a tandem*, hanno un corridoio laterale di scorrimento-smistamento, dal momento che le bufale, disposte in linea una dietro l'altra durante la mungitura, possono uscire dalla posta appena

cessata l'emissione del latte e lasciarla libera per una compagna ancora da mungere.

In tal modo quelle “lunghe da mungere” non creano problemi di attesa per le altre. Negli impianti ben meccanizzati ad ogni operatore possono essere assegnati sei gruppi di mungitura, con una *performance* oraria di 40 capi/uomo, contro i normali 18-20 capi. I principali vantaggi della sala a spina rispetto alla sala a tandem sono la minore superficie coperta, i minori costi d'investimento, i minori spostamenti dell'operatore nella buca e la semplicità delle attrezzature. Per contro, si possono elencare i seguenti svantaggi: movimentazione degli animali e loro posizionamento nelle poste meno agevoli rispetto ad altri tipi di sala e animali meno tranquilli durante la mungitura perché a diretto contatto tra loro. Recentemente sono stati proposti impianti a spina con mungitura da dietro, caratterizzati da un'angolazione degli animali nelle poste variabile da 50 a 70° rispetto all'asse longitudinale della fossa. Queste soluzioni possono essere particolarmente interessanti per la ristrutturazione di sale di mungitura esistenti, perché permettono di potenziare l'impianto aumentando il numero di poste senza variare la superficie occupata.

La *sala a pettine*, è una variante della classica sala a spina di pesce con gli animali disposti con un angolo di 90° rispetto alla fossa del mungitore

e vengono munti da dietro. Gli animali entrano in gruppo, ma si autocatturano singolarmente e in successione all'interno delle poste di mungitura; ciò è possibile grazie a cancelletti o a barre pivottanti sull'asse verticale, che vengono chiusi in sequenza dagli stessi animali che si sistemano nelle poste. I principali vantaggi della sala a pettine sono la rapida movimentazione degli animali in entrata e in uscita, i limitati spostamenti dell'operatore nella buca, la corretta occupazione delle poste anche nel caso in cui il gruppo entrato abbia un numero di capi inferiori al numero delle poste stesse, i minori rischi di infortuni per gli addetti, la riduzione delle cadute dei gruppi di mungitura provocate dagli animali e una maggiore tranquillità degli stessi. Fra gli svantaggi, invece, si ricordano la difficoltà per l'operatore a riconoscere il singolo capo alla posta, il costo d'investimento piuttosto elevato e la maggiore superficie coperta, a parità di numero di poste, rispetto alle sale a spina prive di frontale mobile. Il quarto tipo di impianto, fa parte degli impianti rotativi e si può arrivare fino a 24 stalli. Il mungitore lavora all'interno della "giostra" e ha un buon controllo visivo dell'animale e della mammella. A questo vantaggio si contrappongono il grande diametro della struttura e, quindi, la necessità di grandi superfici coperte per ospitarla (Monetti, 2001). Inoltre esiste un *Sistema robotizzato* che comporta il completo cambiamento dello schema distributivo della stalla,

allo scopo di controllare i percorsi delle bufale e la realizzazione di gabbie di mungitura (tipo tandem) in cui le bufale stesse vengono munte 2-5 volte al giorno. E' opportuno, quindi, premettere la definizione di "robot", o più correttamente di "automa": macchina predisposta per sostituire l'uomo in alcune attività produttive, dotata di una memoria per immagazzinare una quantità significativa di istruzioni; programmabile per eseguire cicli di operazioni differenti e ripetitive. Se questa è la definizione correntemente utilizzata per i robot industriali, si intuisce come nel caso della mungitura si abbia a che fare con macchine molto più complesse ed evolute. Nel nostro caso, infatti, i robot sono predisposti per sostituire l'uomo nelle operazioni di manipolazione del gruppo di mungitura, ma la loro programmazione riguarda cicli non ben definibili e strutturabili e richiede di essere gestita da un complesso sistema di sensori in grado di guidare in tempo reale i movimenti del braccio meccanico. La struttura dei robot deve essere inoltre altamente flessibile per poter intervenire su animali diversi per morfologia e comportamento e inseguirne i movimenti in fase di attacco. Importante è la possibilità di controllare l'alimentazione a mezzo di sistemi di distribuzione automatica. Il sistema sembra adatto per operare al meglio con moduli di circa 50-60 capi, con produzione giornaliera complessiva di 1800-2200 kg di latte, serviti da un robot di mungitura.

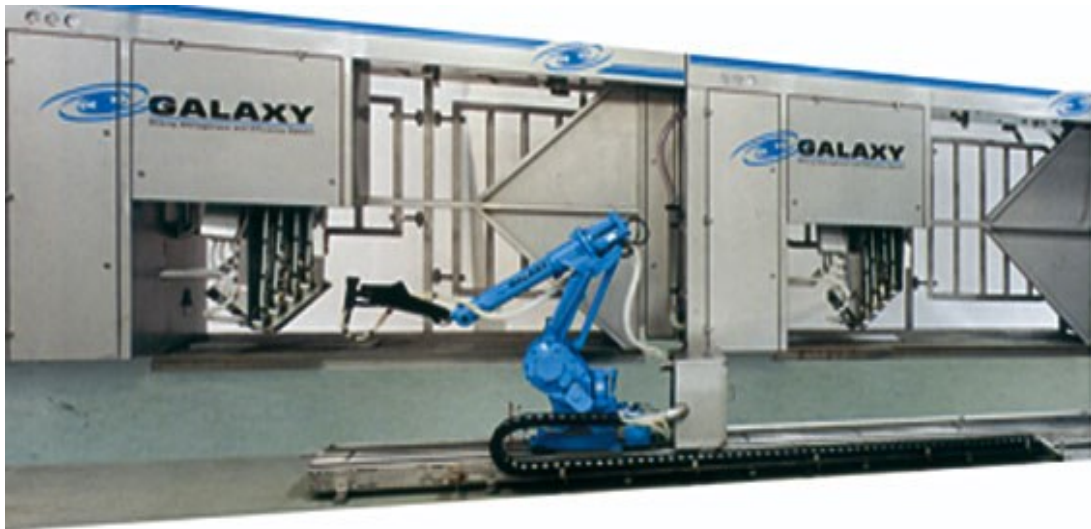


Figura 4. Impianto di mungitura robotizzato

All'uscita della sala di mungitura vengono posti i recinti per l'isolamento degli animali, che devono essere dotati di cancello comandato a distanza dalla fossa dell'operatore e vanno dimensionati sulla base di 1 ogni 20 capi presenti, e per un minimo di 3 capi. La superficie è di 2,0-2,5 m²/capo. La recinzione è costituita da tubi zincati, diametro 50 o 75 mm, e alta 1,5 m.

Il pediluvio, posto sui corridoi di ritorno degli animali, può essere costituito da una semplice vasca profonda 15 cm, lunga 1,5-2,5 m e larga 0,8 m. Per evitare problemi di inquinamento, è opportuno collocare, invece dell'acqua, un materassino di spugna imbevuto di soluzione disinfettante.

All'uscita della sala di mungitura va posto un abbeveratoio a vaschetta di almeno 0,6 m per consentire alle bovine di bere dopo la lunga attesa prima della mungitura.

Il principale problema che si riscontra nella maggior parte delle sale di mungitura è la movimentazione del bestiame. Il tempo che la bufala passa in sala mungitura dovrebbe essere ridotto al minimo ed è molto importante che la posta di mungitura sia di dimensioni sufficienti in proporzione alle dimensioni degli animali da mungere. Spesso infatti, vengono ancora utilizzate delle poste di mungitura vecchie, non adatte alle attuali dimensioni degli animali.

Queste poste, troppo strette, non solo sono scomode per le bufale, ma possono anche creare problemi a causa della errata posizione del gruppo di mungitura in rapporto al corpo dell'animale: quest'ultimo problema, spesso, può essere causa di mastiti. Il capannone che ospita la sala di mungitura dovrebbe essere progettato in modo da assicurare un facile ingresso ed uscita degli animali, riducendo al minimo lo stress dovuto agli spostamenti.

Anche le aree adiacenti alla sala di mungitura, quali i passaggi per raggiungerla e la sala d'attesa, dovrebbero permettere una movimentazione agevole delle bufale ed avere una superficie non scivolosa.

Pertanto, l'applicazione del sistema di mungitura automatizzato (Ams) rappresenta una sostanziale innovazione in allevamento. L'introduzione di questa nuova tecnologia pone alcune questioni riguardanti la gestione degli animali.

Tra gli aspetti emersi, quello di avere un continuo, e possibilmente ordinato, flusso dei soggetti nel robot di mungitura, è risultato essere un obiettivo gestionale fondamentale in un allevamento dotato di tale sistema, per migliorare il benessere e le prestazioni degli animali.

Un flusso ottimale di animali permette infatti di :

- aumentare il numero di mungiture per capo con positive ripercussioni sulla produzione;
- ridurre i tempi di attesa degli animali riducendo quindi possibili fenomeni stressanti;
- distribuire il concentrato con l'autoalimentatore del robot in modo uniforme nella giornata;
- incrementare il numero di mungiture per stallo di mungitura.

Le possibili cause di rallentamento del flusso in mungitura sono state ipotizzate nelle seguenti condizioni :

- la mancanza di abitudine (in particolare per animali nuovi come le primipare);
- eccessiva densità degli animali;

- inadeguato posizionamento del robot;
- stato di salute degli animali, in particolare le condizioni degli arti;
- mancanza di attrattivi verso il robot e/o verso l'area di foraggiamento/autoalimentatori.

Un elevato numero di animali con una bassa frequenza di visite all'Ams (animali non motivati) è la maggiore causa di insuccesso nel sistema di mungitura robotizzato.

I robot di mungitura attualmente presenti sul mercato hanno utilizzato due approcci differenti per risolvere questo problema: il primo prevede il ricorso a dispositivi ed accorgimenti che riducono lo spazio fisico all'interno del box in funzione dell'animale presente al suo interno; il secondo approccio, più rispettoso delle esigenze degli animali, prevede l'utilizzo di dispositivi in grado di monitorare in continuo la posizione del singolo capo, in questo secondo caso, quindi, sarà il robot a dover adattare la sua posizione a quella dell'animale.

4.2 La mungitura

La mungitura, per le sue ripercussioni sull'economia aziendale, sullo stato sanitario delle bufale e sulle caratteristiche qualitative del latte, costituisce un'operazione che necessita di particolare attenzione sia nell'organizzazione che nell'attuazione pratica. Dal punto di vista economico è da rilevare, infatti, che nell'allevamento delle bufale la mungitura è l'operazione che richiede il più elevato impiego di manodopera e la disponibilità di impianti tecnologicamente evoluti. Inoltre tale operazione, se non viene effettuata correttamente, può procurare microlesioni all'interno dei dotti del capezzolo con la conseguente insorgenza di patologie (mastiti) e l'ottenimento di un latte con cariche batteriche negative per qualità e quantità (Bittante et al, 1997).

Il momento della mungitura rappresenta una fase particolarmente delicata del ciclo produttivo, poiché occorre salvaguardare la salute della mammella e l'igiene del latte prodotto. E' opportuno, pertanto, ridurre le cause predisponenti alle infezioni mammarie o all'aumento della carica microbica del latte, sulla quale influiscono lo stato della lettiera e la pulizia dei capezzoli al momento della mungitura.

La corretta preparazione della mammella in fase di pre-mungitura è essenziale per la produzione di latte di alta qualità. Numerosi studi dimostrano quanto sia importante l'interazione uomo/animale nella risposta quantitativa e qualitativa della produzione lattea durante il processo di mungitura (Costa e Reinemann, 2004). Infatti è noto che è di rilevante importanza l'utilizzo di alcuni dei diversi stimoli tattili di routine durante la pre-stimolazione, come il lavaggio dei capezzoli, lo strofinio con un panno caldo, le tettarelle riscaldate e la stimolazione meccanica (Bilek e Zuda, 1959; Sagi et al, 1980b;. Worstorff et al, 1980;. Karch et al, 1989), unitamente alla presenza del vitello e all'alimentazione durante la mungitura (Thomas et al, 2005). La stimolazione del vitello da latte evoca la più forte risposta di espulsione del latte, mentre la pre-stimolazione manuale, è nota per generare una migliore risposta alla stimolazione fornita dal movimento meccanico della mungitrice (Akers e Lefcourt, 1982; Mayer et al, 1984;. Bar-Peled et al, 1995). Come riportato da Thomas (2004), la stimolazione combinata tra la somministrazione dell'alimentazione durante la mungitura e la pre-stimolazione manuale provoca un rilascio più intenso di ossitocina, favorendo una mungitura più veloce ed un miglior svuotamento della mammella. Le bufale differiscono dai bovini in termini di comportamento in quanto hanno più difficoltà ad adattarsi alle

operazioni di mungitura, ma spesso queste difficoltà si riducono drasticamente dopo 4 settimane dal parto (Ramasamy e Singh, 2004).

Gli obiettivi della gestione della mungitura devono garantire l'applicazione di tettarelle visibilmente pulite e performanti in modo da garantire un rapido ed efficiente rilascio di latte. Vale la pena sottolineare che le unità di mungitura devono essere rimosse solo quando la mungitura è completata, per evitare problemi sanitari della ghiandola mammaria.

Inoltre l'operatore deve avere mani, braccia ed indumenti puliti altrimenti potrebbe trasferire patogeni sulla superficie del capezzolo di quarti non-infetti. Diversi studi hanno dimostrato che la disinfezione del capezzolo in pre – mungitura è utile (Galton et al, 1986; Rasmussen et al, 1991; Oliver et al, 1993; Skrzypek et al, 2004; Magnusson et al, 2006), mentre altri lavori hanno dimostrato effetti limitati (Grindal e Bramley 1989). Infatti è stato riscontrato l'incremento di nuove infezioni laddove la pratica del pre-stripping (eliminazione dei primi getti di latte) veniva associata alla preparazione della mammella (Grindal e Bramley, 1989).

L'operatore deve riconoscere, attraverso i primi getti, eventuali anomalie del latte, valutando ad esempio, l'eventuale presenza di frustoli di fibrina, precoci spie dell'insorgenza di un processo infiammatorio. In questa eventualità il latte della bufala, giudicato non idoneo, deve essere

separato, raccolto in apposito contenitore e mai disperso a terra.
(consorzio di tutela MBC, 2008).

Dunque, i principi su cui impostare una corretta routine di mungitura sono i seguenti:

- le bufale devono essere calme prima dell'inizio della mungitura;
- l'ordine di mungitura non è casuale, ma deriva dallo stato sanitario (in un allevamento con problemi di mastiti da patogeni contagiosi occorre dividere gli animali in gruppi e mungere prima il gruppo sano, ed infine il gruppo infetto);
- l'eliminazione dei primi getti dai capezzoli ben puliti e asciutti: va effettuata subito dopo la pulizia del capezzolo, ma è sottovalutata in molte aziende; a tal proposito, Hillerton et al, 1993; affermano che il metodo preventivo della pulizia e preparazione del capezzolo piuttosto che l'uso di sostanze chimiche non influisce sulla salute della mammella in termini di prevenzione delle mastiti. In conclusione, l'immersione del capezzolo con la soluzione iodophor ha dimostrato di migliorare la salute della mammella e diminuire la conta delle cellule somatiche (Shailja e Singh, 2002);
- un adeguato e tempestivo attacco dei gruppi: il peso va distribuito correttamente sui quattro capezzoli avendo cura che nessun fattore

stressante disturbi le bufale e che la macchina mungitrice funzioni in modo ottimale;

- la rimozione corretta dei gruppi alla fine della mungitura: deve avvenire nel momento appropriato, scongiurando così il pericolo della sovra mungitura;
- la disinfezione post-mungitura: questo momento è fondamentale in un'ottica di prevenzione delle infezioni mammarie. Dunque al termine delle operazioni di mungitura deve essere effettuata la disinfezione dei capezzoli mediante loro immersione o trattamento spray con appropriate sostanze ad azione antibatterica, meglio se in grado di formare una sottile pellicola protettiva intorno alla parte distale del capezzolo. Ciò riduce le infezioni mammarie, evitando il possibile ingresso di batteri nella mammella attraverso il dotto papillare quando questo, per effetto della mungitura appena terminata, resta ancora aperto per circa 15 minuti. Dopo ogni mungitura, l'impianto deve essere sottoposto a lavaggio che comprende la detersione e sanitizzazione della mungitrice e delle attrezzature di raccolta del latte.

Per ridurre la possibilità di contaminazione microbica da una bufala all'altra, per effetto del contatto delle guaine, è consigliabile l'immersione del gruppo prendi-capezzolo in una soluzione disinfettante,

seguita da abbondante lavaggio prima della successiva applicazione del gruppo.

Le operazioni di lavaggio e disinfezione della mammella non devono essere eseguite in modo frettoloso e sommario, come spesso accade, ma in modo accurato e preciso specie se le bufale si presentano in sala in condizioni igieniche precarie (interamente ricoperte di fango e liquame), onde evitare l'inquinamento del sistema di mungitura e l'innalzamento della carica batterica del latte.

E' stato dimostrato, infatti, che l'applicazione di un disinfettante in post - mungitura è efficace nel ridurre le infezioni mastitiche (Galton, 2004; Williamson, Lacy-Hulbert, 2010). L'efficacia della disinfezione del capezzolo nel post- mungitura è stata ampiamente accettata tra le buone norme da applicare per il controllo di nuove infezioni intramammarie (IMI) (Natzke et al, 1972; Pankey et al, 1984).

Queste considerazioni sono ancor più valide se riferite alla specie bufalina. Infatti, è noto che bufale sono più sensibili ai fattori stressanti rispetto alle altre specie animali, come dimostrato appunto dall'andamento altalenante dell' eiezione latte o dal rapido blocco della lattazione nei casi di mortalità dei vitelli o della sostituzione della mungitrice utilizzata di routine (Aliev, 1969; Aliev, 1970; Cockrill, 1974; Ragab, 1975; Pathak, 1992). Se gli animali sono stressati o

spaventati, viene secreta una quantità elevata di adrenalina (Aliev, 1969). Questo ormone provoca costrizione dei vasi sanguigni, e, di conseguenza, riduzione del quantitativo di ossitocina in circolo in quanto ha un'azione mirata alle cellule mioepiteliali degli alveoli bloccando i recettori dell'ossitocina. In conclusione, l'immersione dei capezzoli, sia in pre-mungitura che in post-mungitura, con l'utilizzo di disinfettanti efficaci riduce l'esposizione agli agenti patogeni (Sharif et al, 2009).

Immediatamente dopo la mungitura il latte deve essere convogliato, previa filtrazione, nella cosiddetta sala latte, cioè un luogo di conservazione e sosta pulito ed attrezzato in modo da evitare eventuali alterazioni delle sue caratteristiche. Inoltre, se il latte non viene consegnato entro due ore, deve essere rapidamente raffreddato ad una temperatura di 6÷8 °C, essenziale per conservare la qualità ed impedire la rapida moltiplicazione batterica.

Un ruolo importante sulla qualità del latte gioca la velocità di raffreddamento. Entro le prime due ore dopo la mungitura, il latte deve raggiungere una temperatura non superiore a 8 °C. Sarebbe buona regola un raffreddamento rapido mediante l'uso di scambiatore di calore a piastre con acqua gelida, in modo da abbassare la temperatura del latte a 16°C entro dieci minuti dalla produzione.

Un altro aspetto, più importante nel latte di bufala che in quello di vacca, a causa della maggior percentuale di grasso, è quello di evitare l'agitazione violenta del latte in modo da non rompere i globuli di grasso che, più facilmente, vanno incontro ad irrancidimento. Allo stesso scopo, va studiato e progettato l'intero impianto di mungitura, in particolare durante il trasporto del latte si deve evitare l'inglobamento dell'aria ambientale e la rottura dei globuli di grasso (ad es. nelle pompe, nelle curve, all'arrivo del latte nel contenitore frigorifero).

La corretta mungitura consente di ottenere latte di qualità, idoneo alla produzione di "Mozzarella di Bufala Campana". Al contrario, una mungitura non razionale può aumentare l'insorgenza di processi mastitici, riducendo la qualità del latte, che potrebbe risultare non idoneo alla trasformazione in Mozzarella di Bufala Campana. Quindi applicando le procedure vigenti in materia di buone prassi igieniche che permettono di rispettare le disposizioni tecniche specifiche si aiuta l'industria di trasformazione a produrre una "Mozzarella di Bufala Campana" di qualità, aromatica, senza retrogusti, e di più lunga durata commerciale.

4.3 La mungibilità

La struttura della mammella è in stretta relazione con il parametro mungibilità. La mungibilità viene definita come l'attitudine dell'animale a cedere in modo regolare, completo e rapido il latte secreto dalla ghiandola mammaria, in risposta all'applicazione di una corretta tecnica di mungitura (Frigo et al, 2008). Nella bufala viene rilevata direttamente dal mungitore durante la normale routine di mungitura, senza l'ausilio di alcuna apparecchiatura. Nella specie bovina già da qualche anno, la mungibilità è entrata a far parte degli indici genetici di alcune razze, utilizzando una misurazione di tipo quantitativo. Una miglior mungibilità si traduce in tempi di mungitura più brevi con conseguenti minori costi di manodopera, minor utilizzo degli impianti a cui consegue una minor usura e un risparmio in termini energetici. Inoltre, ha un importante effetto anche sugli aspetti di tipo sanitario, che in ultima analisi si riflettono sulla longevità (Degano, 2005).

Ricercatori di diverse parti del mondo hanno segnalato difficoltà relative alla mungibilità dei bufali in quanto questi animali sono stati descritti come "mungitori difficili" e sono stati evidenziati altri tipi di problemi legati all'emissione del latte (Thomas e Anantakrishnan, 1949; Marathe

e Whittlestone, 1958; Aliev, 1969; Ragab, 1975; Gangwar, 1976; Alim, Barbari e Bardran 1977; Alim, 1982; Alim, 1983; Sastry et al, 1988). E' ben noto che la lunghezza del canale del capezzolo della vacca da latte, il diametro effettivo e la forza dello sfintere influenzano la velocità del flusso del latte e, quindi, la salute della mammella (Nickerson, 1992).

In uno studio, si è osservato che i bufali hanno canali del capezzolo molto più lunghi rispetto alle vacche da latte (El-Ghousien et al, 2002).

Questo studio anatomico comparativo tra bovini e bufali egiziani macellati, ha segnalato che i canali dei capezzoli erano dal 30 al 40% più lunghi nei bufali rispetto alle vacche. Dunque, dovendo far fluire il latte attraverso un canale del capezzolo più lungo, e con una resistenza muscolare apparentemente più forte. Aliev (1969) suggerisce una pressione di vuoto superiore a 30 kPa per rilassare lo sfintere del capezzolo dei bufali e favorire l'eiezione latte. Nelle vacche si è visto che è sufficiente meno di 20 kPa per aprire il canale del capezzolo (Weiss et al, 2004). Questo potrebbe essere il motivo per cui sono stati utilizzati livelli di vuoto molto più alti per la mungitura nei bufali rispetto a quelli utilizzati per gli altri animali (Thomas e Anantakrishnan, 1949; Marathe e Whittlestone, 1958; Aliev, 1969; Alim, 1982).

La mungibilità è un fattore tipico e caratteristico di ciascuna specie (ad esempio bufala, vacca, pecora, e capra) ed è influenzato da fattori anatomici ed ambientali (Thomas, 2004).

Nello specifico, i fattori che possono influenzare la mungibilità possono essere intrinseci ed estrinseci; i fattori intrinseci dell'animale possono essere ad esempio, la capacità di rilascio dell'ossitocina da parte dell'ipofisi e la forma dei capezzoli. Questi fattori sono suddivisibili in due componenti: quella genetica e quella ambientale (permanente e temporanea). La componente permanente fa parte delle caratteristiche intrinseche dell'animale e si manifesterà quindi per tutta la durata della sua carriera, mentre quella temporanea è maggiormente legata a fenomeni casuali come ad esempio una mastite in lattazione o stress temporanei; i fattori estrinseci dell'animale, invece, possono essere le condizioni di allevamento, la funzionalità dell'impianto e l'operatività dei mungitori. È chiaro che una migliore mungibilità porti a tempi di mungitura minori e tempi di sollecitazione meccanica degli sfinteri papillari meno prolungati (Frigo et al, 2008).

La mungibilità, è un parametro importante di selezione, in quanto collegato strettamente all'ottimizzazione della gestione della sala di mungitura e di tutte le routine ad esso collegate. Il problema della mungibilità è particolarmente sentito nella specie bufalina dove tempi di

mungitura differenti tra gli animali possono costituire un aggravio di spesa non trascurabile per l'allevatore, che vede allungarsi i tempi di mungitura, con maggior dispendio di energia ed aumento del fabbisogno di mano d'opera, in termini di ore lavorative richieste, e aumentare le spese farmaceutiche per un impiego troppo diffuso di ossitocina sugli animali in lattazione.

CAPITOLO II

5. CENNI SUL PROCESSO FLOGISTICO A CARICO DELLA MAMMELLA

5.1 La mastite

Per mastite si intende un processo infiammatorio a carico della ghiandola mammaria che può essere di natura infettiva, traumatica o tossica (International Dairy Federation, 1987). E' la risultante dell'interazione fra ospite, patogeno e ambiente. Quando questo equilibrio viene ad alterarsi, si ha l'instaurarsi della malattia. La colonizzazione della mammella da parte dei microrganismi avviene solitamente per via ascendente e cioè attraverso il capezzolo. Il capezzolo sano si oppone all'ingresso dei patogeni attraverso barriere fisiche (sfintere del capezzolo e cheratina), cellulari (globuli bianchi) e umorali (enzimi e immunoglobuline). Quindi fra i fattori predisponenti intrinseci

annoveriamo la diminuzione delle difese immunitarie dell'animale e la patogenicità del microrganismo, e fra gli estrinseci l'ambiente, la stabulazione e in generale il management aziendale.

Il processo infiammatorio a carico della mammella si sviluppa in 3 fasi ben distinte :

- I. fase (invasione), rappresenta la fase di latenza in cui si ha la presenza del germe senza causare aumento del numero di cellule somatiche nel latte ed é in funzione della patogenicità del germe e dei fattori condizionanti;
- II. fase (colonizzazione), in cui si verifica la colonizzazione del tessuto mammario da parte degli agenti patogeni;
- III. fase (moltiplicazione del germe), in cui si osserva un aumento delle cellule somatiche (polimorfonucleati neutrofili e macrofagi), di enzimi cellulari (perossidasi, lisozima), e di proteine di derivazione ematica (fibrinogeno, albumina, immunoglobuline ecc).

Sebbene in passato ci sono stati diversi miti sulla resistenza alle patologie, compresa l'insorgenza di mastiti, della specie bufalina rispetto alla specie bovina, oggi sappiamo che questi animali hanno problemi di salute simili a quelli dei bovini, compreso il manifestarsi di casi di mastite (Sollecito et al, 2011), tanto da rappresentare la malattia più costosa del settore lattiero-caseario (Wanasinghe, 1985).

Certamente è una malattia con alta prevalenza nei bovini da latte, e rappresenta una delle più importanti patologie che colpisce l'industria lattiero-casearia in quanto provoca ridotta produzione ed effetti deleteri sulla composizione chimica e citologica del latte recando un pesante onere economico in tutto il mondo sui produttori a base di latte (Miller e Dorn, 1990; Miller et al, 1993; Bennet et al, 1999). Inoltre, se sostenuta da particolari agenti batterici/infettivi, può risultare dannosa per la salute umana. Anche la terapia per le mastiti si traduce spesso nella presenza di residui di antibiotici nel latte rendendolo inadatto sia al consumo umano che per ulteriori trattamenti. Generalmente porta ad infiammazione di uno o più quarti della ghiandola mammaria e spesso colpisce non solo il singolo animale, ma tutta la mandria. Se non trattata, la condizione può portare ad un deterioramento del benessere degli animali con conseguente abbattimento dei soggetti colpiti, o addirittura alla morte.

Come in ogni latte crudo, i microrganismi possono moltiplicarsi rapidamente nel latte di bufala per il suo alto contenuto di nutrienti.

La reazione infiammatoria della mammella mira a distruggere o neutralizzare gli agenti infettivi e le loro tossine al fine di consentire alla ghiandola di riprendere la sua normale funzionalità (Galiero, 2002).

Inoltre la mastite è considerata anche come patologia condizionata, una così detta “tecnopatia”, in quanto è quasi sempre favorita da condizioni di allevamento sbagliate.

Malgrado i progressi della scienza e della tecnologia, molti allevatori ancora debbono combattere, a volte invano, questa patologia. In realtà il problema è risolvibile e ci sono numerosi esempi di allevamenti in cui il numero di mastiti cliniche, il livello di cellule somatiche e la qualità del latte sono ottimali. Questo si traduce in un maggiore reddito per gli allevatori, una maggiore soddisfazione per il lavoro svolto e, non ultimo, un maggior benessere per gli animali.(Zecconi, 2013).

Sono state proposte molte classificazioni di mastite, sulla base eziologica, clinica o degli aspetti patologici della malattia. La mastite può essere classificata in base alla causa, in base alle forme cliniche, subcliniche e croniche, in base alla gravità, alla durata, alla natura dell'essudato.

5.2 Diagnosi eziologica e clinica di mastite e patogenesi

La diagnosi eziologica delle infezioni mammarie rappresenta un settore particolarmente delicato delle attività di laboratorio; gli addetti ai lavori conoscono in genere i molteplici fattori limitanti, i compromessi necessari e le cause di variabilità di questo tipo di attività analitica. Non sempre invece questi aspetti sono noti a chi utilizza ed interpreta i risultati delle analisi per la loro applicazione in campo.

La conoscenza e la condivisione delle scelte applicative delle tecniche analitiche sono indispensabili, oltre che per la corretta interpretazione dei risultati e la loro applicazione in campo, anche per l'assemblamento dei dati provenienti da più laboratori, la creazione di database informativi, le valutazioni statistiche ed i programmi di sorveglianza epidemiologica in un settore decisamente particolare e specialistico come quello delle mastopatie di natura infettiva (Bolzoni et al, 2006).

Da un punto di vista eziologico, è indiscutibile che i più comuni agenti causali di mastite sono i batteri, seguiti a distanza da micoplasmi funghi, lieviti, e chlamydia (Guarda e Mandelli, 2002).

Anche nella bufala la mastite è quasi sempre provocata da batteri, i quali, dopo aver raggiunto la mammella, la invadono moltiplicandosi nei tessuti secernenti. Sono invece meno frequenti le forme dovute a lieviti, muffe ed alghe, ma è altrettanto noto che molteplici fattori predisponenti (anatomici, immunologici, igienici e tecnologici) giocano un ruolo decisivo sull'insorgenza, evoluzione individuale e diffusione collettiva di tali processi. Sono colpite quasi esclusivamente le mammelle in lattazione.

In termini patogenetici, le mastiti possono insorgere per diverse vie, cioè quella ematogena (discendente), quella percutanea (diretta) e quella galattogena (ascendente), ma è quest'ultima ad essere coinvolta nella maggior parte dei casi (Guarda e Mandelli, 2002).

Quindi considerando sempre tali fattori, in confronto alle altre specie animali i bufali hanno alcune caratteristiche che possono contribuire ad un maggior rischio di mastiti come le mammelle più pendule e i capezzoli più lunghi. Viceversa, i bufali hanno un canale del capezzolo lungo e stretto, che può essere un impedimento all'invasione dei microrganismi. A tal proposito, Krishnaswamy et al, (1965) hanno dichiarato che lo sfintere del capezzolo dei bufali ha fibre muscolari maggiormente predisposte a creare un miglior ostacolo all'invasione dei microorganismi rispetto alle vacche.

Inoltre, tra i meccanismi patogenetici, l'adesione dei batteri Gram positivi e Gram negativi alle cellule epiteliali è ritenuta necessaria per la colonizzazione della ghiandola mammaria. Questa ipotesi si basa principalmente sulla constatazione che, in vitro, gli agenti patogeni della mastite hanno diverse cellule bersaglio specifiche e sembrano utilizzare diversi meccanismi di adesione. Inoltre diversi enzimi, ialuronidasi, lecitinasi, emolisina, collagenasi e chinasi agiscono come fattori aggressivi di invasione dei tessuti ospitanti.

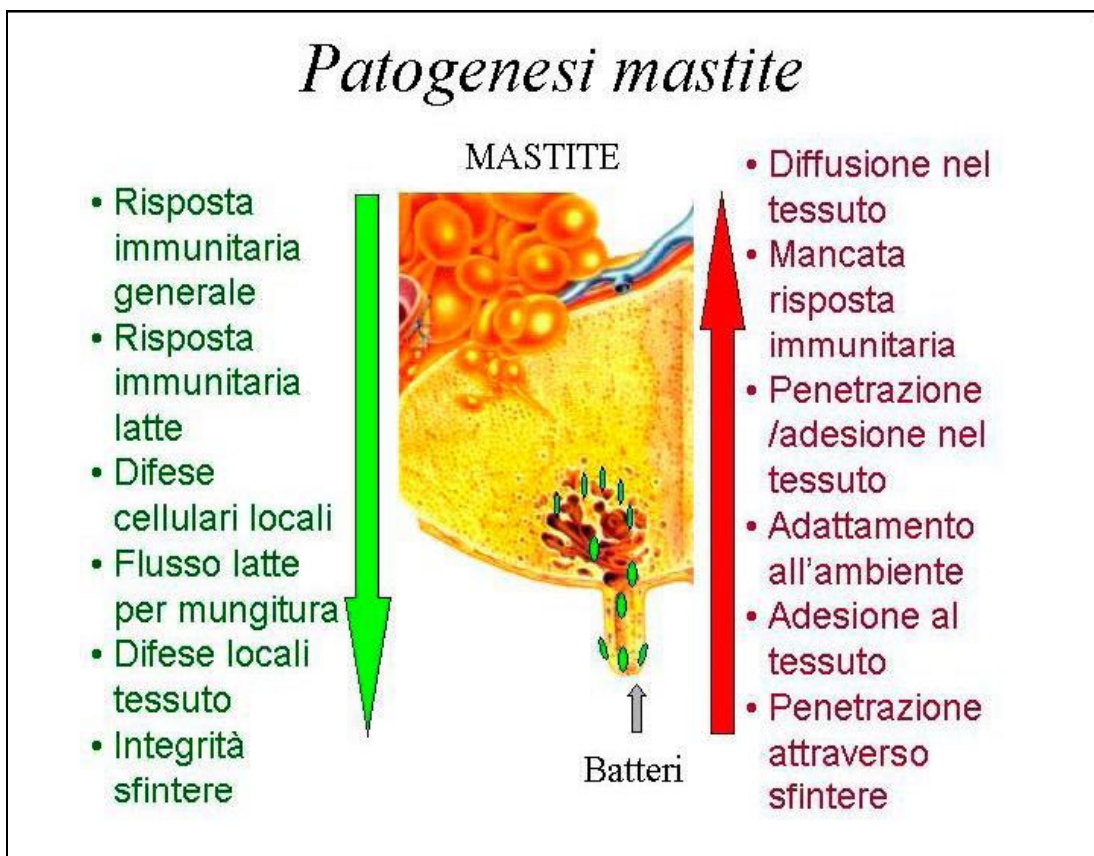


Figura 5: Schema che riassume gli eventi che portano allo sviluppo di un'infezione mammaria (Quaderni della Ricerca, 2004).

I principali batteri vengono classificati in base al loro serbatoio (reservoir) in:

- **contagiosi** (Streptococcus agalactiae, Arcanobacterium Pyogenes, Staphylococcus aureus, Corynebacterium bovis e Mycoplasma);
- **ambientali** (Streptococchi e Gram negativi);
- **opportunisti** (Stafilococchi coagulasi negativi).

Tale classificazione è funzionale agli interventi da applicare per poterli controllare in allevamento. Ciascuno di questi microrganismi può causare mastite e la corretta identificazione dei batteri presenti in allevamento e dei diversi fattori predisponenti sono fondamentali per l'applicazione di razionali programmi di controllo. Qualunque sia il patogeno coinvolto, questo arriva alla mammella esclusivamente attraverso il capezzolo. Le uniche eccezioni sono rappresentate da eventuali infezioni sistemiche (ad esempio listeriosi, salmonellosi, micoplasmosi) che possono avere, tra le altre, una localizzazione mammaria, ma in tal caso i problemi da affrontare non sono certamente quelli mammari.

Pertanto, la mammella si infetta quando i batteri penetrano nel canale del capezzolo e si moltiplicano nella ghiandola. L'invasione batterica determina una reazione infiammatoria ed immunitaria da cui l'aumento delle cellule somatiche, che ha lo scopo di eliminare i patogeni, quindi la

capacità di questi ultimi di sopravvivere all'azione delle difese immunitarie della mammella, determinerà l'esito dell'infezione. Di solito la maggior parte delle infezioni sono causate da patogeni contagiosi *S. aureus*, *Str. agalactiae*, e da patogeni ambientali *Str. uberis*, *Str. dysgalactiae*, Coliformi (*E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) *Pseudomonas*, *Prototheca*, e anche da lieviti. Questi agenti patogeni infettano le mammelle nella maggior parte dei casi attraverso il dotto papillare, che è l'unica apertura della mammella al mondo esterno. Lo *S. aureus* rappresenta il patogeno più problematico e significativo della mastite contagiosa a causa della presenza di ceppi patogeni particolarmente resistenti agli antibiotici.

Per quanto riguarda le diverse forme di mastite potremmo così suddividerle :

- **Cliniche**: che a loro volta, in base al decorso e all'intensità dei sintomi, vengono distinte in: *iperacute*, con risentimento generale (temperatura, atonia ruminale, collasso, ecc.), vistose alterazioni del quarto e del latte e talvolta morte dell'animale, *acute*, caratterizzate da mammella con il quarto o i quarti colpiti ingrossati, induriti, edematosi, arrossati, caldi, dolenti. La secrezione latte è macroscopicamente alterata (coaguli, fiocchi di fibrina, latte acquoso con colorazione anomala) anche con

referimento alla sua composizione. La produzione di latte si riduce fortemente fino all'agalassia. È presente una sintomatologia generale con febbre e alterazioni della funzionalità ruminale, *subacute*, caratterizzate da una riduzione del latte prodotto, aumento delle cellule somatiche, presenza di materiale coagulato nei primi getti. La bufala in genere non presenta sintomi generali. (Mariani et al, 2004) Ci sono due tipi di mastiti cliniche; la *forma catarrale* che consiste in un'inflammatione delle mucose della cisterna e del capezzolo, della mammella e dei dotti galattofori, con conseguente ridotta secrezione latte e la *forma parenchimatosa* che è un'inflammatione degli alveoli e dei dotti del tessuto connettivale con interessamento della circolazione ematica e linfatica (la mammella è dura, calda e dolente);

- **Subcliniche**: sono quelle che dobbiamo bloccare e scoprire al più presto perché oggi sono le più subdole nel manifestarsi e sono le più frequenti. Non mostrano nessun segno esterno, l'unico fattore che determina la presenza di un'infezione subclinica, e non sempre, è un numero di cellule somatiche più alto del normale. È un'infezione mammaria latente spesso caratterizzata da: alterazione della composizione del latte, aumento del numero di cellule somatiche, aumento del numero di WBC (macrofagi,

neutrofili e polimorfo nucleati), aumento delle proteine plasmatiche: fibrinogeno, albumina, antitripsina e immunoglobuline, aumento degli enzimi cellulari. Ai fini di valutare correttamente lo stato sanitario dell'allevamento, si effettua un'analisi del contenuto cellulare (nel latte di massa, in assenza ovviamente di mastiti cliniche): se esso è superiore a 300,000/400,000 cell/ml si sospetta la presenza di mastiti subcliniche;

- **Croniche**: si tratta spesso di un'evoluzione delle forme acute o sub-acute curate male, cioè con antibiotico inadatto o, più spesso, con una posologia insufficiente. La produzione di latte si riduce significativamente per mancata funzionalità del parenchima mammario che può presentarsi più grande e indurito o decisamente ridotto. La conta cellulare è elevata ma le alterazioni del latte possono non essere evidenti. (Mariani et al, 2004)

5.3 Cambiamenti delle cellule somatiche in corso di mastite

La definizione di mastite ed una sua corretta classificazione, come abbiamo visto, non comprende solo l'analisi batteriologica, ma anche quella citologica (conta delle cellule somatiche). Le diverse classi di cellule somatiche nel latte si evidenziano mediante osservazione microscopica di strisci sottili, colorati, secondo la metodica di May-Grunwald o di Wright. Si tratta di colorazioni "panottiche", basate, entrambe, sulla reazione di Sali di Eosina/Blu di Metilene con i vari costituenti acidi e basici delle cellule stesse (detti pertanto acidofili, basofili, policromatofili). Dette colorazioni consentono di distinguere con chiarezza sia le diverse classi di granulociti (cellule polinucleate), sia i linfociti (cellule mononucleate). Oramai universalmente accettati, infatti, sono i parametri per il loro riconoscimento, basati su caratteristiche tintoriali e morfologiche ben evidenziabili con le metodiche di colorazione suddette. D'altro canto, tali cellule del bufalo non si differenziano molto da quelle analoghe, presenti nel sangue umano, per le quali la conoscenza e la pratica di laboratorio sono consolidate da anni.

Nel latte bufalino si afferma che i macrofagi rappresentano la grande maggioranza delle cellule somatiche del latte sano di bufala nelle diverse fasi della lattazione (Guarino et al, 1994).

Sulla tipologia delle cellule somatiche, in bibliografia sono riportati dati contraddittori. Il tipo cellulare dominante nel latte di bufala proveniente da mammelle sane sembra essere rappresentato dalle cellule epiteliali per Dhakal et al, (1991) o dai neutrofili per Silva e Silva (1994) o dai macrofagi secondo Guarino et al, (1994) o ancora dai linfociti seguiti immediatamente dai neutrofili (Piccinini et al, 2006). In caso di mastite, invece, è stato sempre osservato un aumento della percentuale dei neutrofili (Ranucci et al, 1988; Dhakal et al, 1991; Guarino et al, 1994; Piccinini et al, 2006).

La conta delle cellule somatiche, anche in assenza di un isolamento di patogeni, può dare utili indicazioni sullo stato sanitario della mammella e della qualità del latte. Il numero delle cellule somatiche varia in relazione a diversi fattori quali mastiti, stadio di lattazione, stagione, produzione di latte e numero di lattazioni (Santillo et al, 2011).

Le cellule somatiche presenti nel latte sono i leucociti (globuli bianchi del sangue) e le cellule di sfaldamento provenienti dal tessuto mammario. In ogni situazione sistemica o specifica di disturbo mammario, (una malattia sistemica, mastite, mungitura incompleta,

cattivo funzionamento della macchina mungitrice, dieta sbagliata), il numero di cellule del singolo capo bufalino o di tutto il gruppo aumenta proporzionalmente alla quantità ridotta di latte prodotto, poiché i leucociti, soprattutto i leucociti polimorfonucleati, si infiltrano nel tessuto mammario, come risposta all' evento patologico (Galiero e Morena, 2000). Tuttavia, le cellule somatiche non solo sono riconosciute a livello mondiale come indice di infiammazione mammaria (Smith, 2002), ma rappresentano un campanello d'allarme di gestione aziendale errata, di scarsa qualità del latte, di un disagio generale e di stress mammario (Galiero e Morena, 2000). La conta delle cellule somatiche serve a misurare il grado di sofferenza della mammella dovuto a: maltrattamenti, infiammazioni, mastiti subcliniche o manifeste.

Pertanto, sono utilizzate per valutare lo stato di salute della mammella e l'idoneità del latte destinato al consumo umano (Reichmuth, 1975; Harmon, 1994), e per valutare la gestione aziendale. Inoltre, un aumento potrebbe essere legato alla normale attività del sistema immunitario della mammella (Burton e Erskine, 2003). Un aumento delle cellule somatiche può (SCC) influire sulla qualità e shelf-life del latte pastorizzato (Ma et al, 2000) apportando proteolisi, in modo da influenzare negativamente sulla mozzarella prodotta e sulla sua qualità.

Studi passati hanno evidenziato che le cellule somatiche nel latte bufalino, in condizioni di normalità, si aggirano mediamente su valori che non superano le 300,000 unità/ml (Silva e Silva, 1994). La conta standard delle cellule somatiche nei bufali è diversa da quella che normalmente si verifica nei bovini. I valori più bassi di CCS non indicano necessariamente l'assenza di infezione endomammaria. I parametri utilizzati per il bestiame di CCS potrebbero non essere adatti per il monitoraggio della mastite nell'allevamento bufalino (Carvalho et al, 2007).

I fattori condizionanti le cellule somatiche sono riportati nel seguente prospetto.

FATTORI CONDIZIONANTI	IMPORTANZA		
Impianto e tecnica di mungitura			
Ambiente			
Gestione dell'allevamento			
Profilassi e terapia delle mastiti			
Alimentazione			

Quando le cellule somatiche sono tra 200,000 e 400,000/ml non ci sono effetti rilevanti sulla produzione e sulla qualità del latte.

Se, invece, le cellule somatiche sono superiori a 400,000/ml si hanno i seguenti effetti sulla produzione e qualità del latte:

- La produzione di latte diminuisce di circa un quarto rispetto a quella osservata per contenuti di cellule somatiche inferiori;
- La resa giornaliera stimata in mozzarella è inferiore di circa un quarto;
- L'indice di caseina è inferiore all'80%;
- Il tempo di coagulazione si allunga di circa quattro minuti.

Indicatori

- Gli agenti mastitogeni presenti sono tutti patogeni;
- Il pH è maggiore di 6,7;
- Il lattosio è inferiore a 4,5%;
- Il contenuto di cloruri è superiore a 1 mg/ml;
- Il contenuto di neutrofili è superiore al 60%.

Il numero delle cellule somatiche aumenta per:

- a) alterato funzionamento della macchina mungitrice, errata manualità nelle varie fasi della mungitura, problemi di mungibilità di determinate bufale per cattiva conformazione o altro;
- b) scarsa igiene dell'ambiente, delle operazioni di mungitura, condizioni di stress (sovraffollamento) e presenza e diffusione di agenti patogeni causa di infezioni (mastiti);

c) squilibri alimentari o alimenti mal conservati (presenza di muffe, micotossine, fermentazioni anomale, ecc.).

La strumentazione automatica di routine per la conta delle cellule somatiche nel latte sino ad ora è stata progettata per ottimizzare l'accuratezza nel latte di vacca essendo questa la specie più largamente analizzata nel settore lattiero caseario. Per la determinazione del contenuto di cellule somatiche nel latte di bufala l'ottimizzazione della risposta strumentale consentirà di valutare correttamente la risposta immunitaria degli animali controllati, stabilirne la concentrazione fisiologica di cellule e quindi poter diagnosticare ed intervenire tempestivamente in caso di mastite (Orlandini et al, 2007).

5.4 Protocollo di intervento in corso di mastite

Per la diagnosi della mastite l'esame batteriologico del latte è la tecnica analitica di elezione essendo costituito da un insieme di tecniche di laboratorio volte ad isolare ed identificare il microrganismo responsabile di un processo patologico a carico della mammella.

L'approccio terapeutico per le mastiti ambientali è diverso dalle mastiti contagiose perché le misure che si adottano per il controllo delle forme contagiose, non sono necessarie anzi spesso sono inefficaci nel caso di mastiti sostenute da agenti eziologici ambientali.

Protocollo di intervento per le mastiti contagiose

- 1° fase: Esame batteriologico ed antibiogramma sul latte proveniente da tutti i capi in lattazione;
- 2° fase: Suddivisione e separazione in gruppi di tutti i capi presenti;
- 3° fase: Trattamento dei soggetti in asciutta con le molecole risultate più idonee all'antibiogramma;
- 4° fase: Ripetizione delle analisi di laboratorio dopo 7 giorni dal parto e successivo smistamento dei capi.

E' stato messo a punto un protocollo analitico tale da poter eseguire un'analisi più accurata sull'azienda bufalina da esaminare in corso di mastite.

Per ottenere il risanamento di un allevamento bufalino da mastite contagiosa gli animali vengono suddivisi in 5 gruppi;

P1: animali con doppia mungitura NEGATIVI più primipare;

P2: animali con singola mungitura NEGATIVI (con una produzione inferiore a 5 litri);

P3: animali POSITIVI (a doppia o a singola mungitura);

P4: gruppo di attesa per analisi in corso (pluripare) dopo 7 giorni dal parto;

P5: gruppo di animali in asciutta.

Dopo 7 giorni dal parto viene eseguito un batteriologico sul latte delle pluripare e delle primipare e successivamente vengono smistate nei diversi gruppi in funzione dei risultati.

Le primipare quasi sempre risultano negative all'esame batteriologico.

Le analisi, poi vengono ripetute ogni 4-5 mesi anche a tutti i bufali negativi.

Le bufale positive non sono trattate durante la lattazione; i trattamenti vengono effettuati in asciutta nel seguente modo:

- NEGATIVI: solo trattamento locale con antibiotico
- POSITIVI: terapia antibiotica generale ogni tre giorni per due volte e trattamento locale;
- CON SINTOMI DI MASTITE: in genere provenienti da P1 o P3 vengono trasferiti in un ambiente separato (infermeria) e trattati con terapia locale e generale a seconda della gravità.

I soggetti con ascessi mammari vengono macellati.

5.5 Importanza economica della mastite

La mastite è tra le principali voci di costo che contribuiscono a ridurre il reddito aziendale. Questo concetto è ormai noto agli addetti ai lavori ma, spesso, ci si dimentica che il costo di una mastite non si riduce alla terapia, ma ci sono anche i costi legati alla perdita produttiva (intesa come calo produttivo e come latte scartato a causa dei tempi di sospensione), i costi per consulenza del veterinario, il lavoro da dedicare per i trattamenti, la riduzione della qualità del latte e, nei casi più gravi, la necessità di macellare precocemente gli animali in lattazione. Inoltre un animale affetto da mastite, anche subclinica, può essere più sensibile a sviluppare altre patologie potenziali con conseguenti altre potenziali perdite. L'importanza economica di questa patologia non è però equivalente tra aziende diverse, né tra regioni o stati differenti. Infatti, maggiore è la spinta produttiva dell'azienda, maggiori saranno le perdite economiche. La percezione del costo della mastite da parte dell'allevatore non sempre è aderente alla reale situazione. Per questo motivo è necessario avere un dato specifico, calcolato per ciascuna azienda, come punto di partenza per valutare quale approccio al problema sia necessario in ciascuna situazione (Huijps et al, 2008).

Le strategie di intervento devono basarsi innanzitutto sulla conoscenza dei fattori predisponenti e favorenti poiché il loro controllo risulta decisivo per contenere il numero degli episodi mastitici.

Le conseguenze in corso di mastite sono: il calo della produzione, aggiunta costi diretti di cura per l'animale, la possibile perdita delle mammelle e nei casi più gravi la morte dell'animale.

Per poter ridurre l'impatto di questa patologia mammaria la strada migliore è sicuramente la prevenzione e quindi tutte le pratiche igieniche e di buona gestione della mandria, che vanno dalla pulizia degli spazi e delle attrezzature preposte per gli animali, fino ad un' adeguata formazione del personale che lavora in azienda.

Precisamente, per un allevamento da considerare sempre al top, è fondamentale che la triade **ambiente-genetica-alimentazione** sia sempre in equilibrio: se viene meno uno di questi tre fattori anche la capacità di un allevamento di generare reddito viene compromessa (Natale, 2013).

5.6 Allestimento dell' antibiogramma

L'antibiogramma consiste nella valutazione *in vitro* dell'attività delle diverse classi di molecole antibiotiche nei confronti di uno specifico agente batterico ed ha funzione di “servizio diagnostico” utile ad orientare la terapia.

Nel caso di agenti di mastite *contagiosa*, in cui si presume una circolazione di uno stesso ceppo nell'allevamento, i risultati dell'antibiogramma sono generalmente utilizzabili sul gruppo, estendendo la sua applicazione a tutti gli animali infetti. In questo caso il monitoraggio mediante antibiogramma ha anche la funzione di verificare nel tempo lo sviluppo di eventuali resistenze nei confronti di determinate categorie di antibiotici (valutazione del trend in azienda).

Nel caso di agenti batterici di origine *ambientale*, i risultati dell'antibiogramma sono rappresentativi per il solo agente testato, poiché gli isolati possono avere spettri di sensibilità anche molto diversi tra loro.

Una possibile ed importante applicazione dell'antibiogramma sugli isolati di *S. aureus* riguarda la valutazione della resistenza ad oxacillina che rappresenta un marker della resistenza a tutti gli antibiotici beta-lattamici (dalle penicilline alle cefalosporine di terza e quarta

generazione); la resistenza all'oxacillina, valutata applicando procedure di laboratorio rigorose e con evidenza di validità, ha un ottimo potere predittivo nei confronti della presenza dei geni *mec* ed in particolare del gene *mecA*, caratteristico dei ceppi meticillino-resistenti (MRSA). L'incidenza di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) sia in medicina umana che in veterinaria è in forte aumento (Mallardo et al, 2013). C'è una quantità limitata di informazioni disponibili su MRS negli animali rispetto all'uomo; tuttavia, gli animali che vivono in stretto contatto con portatori di MRSA umani potrebbero diventare veicolo di MRSA portando infezioni ricorrenti nell'uomo. Pertanto, è importante identificare la fonte di colonizzazione da MRSA negli animali, poiché potrebbero essere la causa del trasporto inspiegabile o eventuale ricaduta di infezione nell'uomo (Rich et al, 2004).

Monitorare la presenza di *S.aureus* meticillino-resistenti in allevamento, oltre che per ovvi motivi di Sanità Pubblica Veterinaria, è importante perché, oltre alla resistenza nei confronti di tutti i betalattamici, spesso nei cloni di MRSA circolanti nelle produzioni zootecniche si osserva resistenza ad altre classi di molecole, ovvero multiresistenza (Arrigoni et al, 2014).

5.7 Trattamento della mastite e problema dell'antibiotico resistenza

La terapia delle mastiti prevede l'uso di composti farmacologicamente attivi, in prevalenza antibiotici, con una percentuale di successo compresa tra il 20 ed il 90%, a seconda del tipo e dello stadio dell'infiammazione. Gli antibiotici sono farmaci fondamentali per il controllo delle malattie infettive dell'uomo e degli animali. Hanno inoltre contribuito al miglioramento delle produzioni zootecniche: controllando le infezioni batteriche, essi permettono il mantenimento del buono stato di salute degli animali e, al contempo, riducono la possibilità che la malattia possa estendersi dall'animale all'uomo. L'efficacia della terapia nel periodo di non allattamento ha dimostrato di essere superiore a quello che può essere raggiunto durante l'allattamento. Il trattamento convenzionale è quello dell' utilizzo di antibiotici. Ci sarebbero anche terapie alternative con sostanze omeopatiche o a base di erbe. Il trattamento precoce delle mastiti dà una maggiore probabilità di eliminazione dei batteri (Milner et al, 1997).

Tuttavia, residui di antibiotici usati nella produzione di animali da carne e/o latte possono entrare nella catena alimentare umana aumentando il

rischio per la salute dei consumatori, a causa di effetti allergici o comunque nocivi che tali sostanze possono avere. Inoltre, residui di antibiotici trasferiti all'uomo dagli alimenti possono contribuire alla selezione di batteri resistenti nell'individuo che ha consumato l'alimento contaminato. Negli ultimi anni, infatti, si è assistito all'emergenza e alla diffusione di fenomeni di antibiotico-resistenza, con possibili rischi per la salute pubblica (Busani et al, 2003).

La resistenza dei microrganismi agli antibiotici è attualmente considerata, a livello mondiale, come uno dei principali problemi della sanità pubblica, e coinvolge in modo equivalente la medicina umana e la medicina veterinaria. E' stato ampiamente dimostrato come l'utilizzo di antibiotici negli animali porti alla selezione di ceppi resistenti che hanno la possibilità di colonizzare l'intestino e, conseguentemente, di essere escreti e di contaminare l'ambiente e gli alimenti derivati (Ricci et al, 2003). Questi risultati sono particolarmente interessanti e portano a sottolineare la necessità sia di istituire piani di monitoraggio dell'antibiotico-resistenza a livello nazionale, sia di promuovere l'applicazione di pratiche di uso prudente degli antibiotici nel settore zootecnico.

L'incidenza e la prevalenza della mastite potrebbe ridursi nelle bufale attraverso l'adeguamento di un efficiente programma di gestione. Anche

se, la vaccinazione è stata riconosciuta come uno degli strumenti efficaci per la prevenzione delle mastiti nelle bufale, non è completamente efficace vista la presenza di numerosi agenti eziologici nei paesi in via di sviluppo. (Sharif et al, 2009)

5.8 Le mastiti nella bufala

Nella bufala i germi Gram positivi sono i principali responsabili dei problemi alla mammella; dati riportati in bibliografia dimostrano che i microrganismi maggiormente isolati sono stati lo *Staphylococcus aureus* e lo *Streptococcus agalactiae* (Fraulo et al, 2009, Pascale, 2009/2011).

S. aureus è il ceppo patogeno più comune di mastite contagiosa isolato dai casi di mastite sub-clinica dei bufali (Dhakal, 2006). Anche Sharif et al, (2007) isolarono lo S. aureus (50%), lo Str. agalactiae (15%), e una crescita mista di S. aureus e Str. agalactiae (15%) e pure di stafilococchi coagulasi negativi (CNS) (20%).

Generalmente gli stafilococchi colonizzano la pelle. Abrasioni del capezzolo a fine mungitura (qualora sia anche difettosa) incoraggiano il trasferimento di batteri alla mammella. Possono causare mastiti

soprattutto subcliniche e rimanere per lungo tempo in azienda. Lo *Str. agalactiae* è un rigoroso patogeno della mammella e può essere trasmesso esclusivamente durante la procedura di mungitura, causa mastite clinica e soprattutto subclinica inducendo un notevole aumento del numero di cellule somatiche e una diminuzione significativa della secrezione lattea. I sintomi clinici possono variare da lievi a moderati e possono verificarsi coaguli nel latte. La mastite da streptococco di solito non è fatale, né provoca particolari problemi per il trattamento terapeutico. Per quanto riguarda i patogeni ambientali, come i Coliformi, la contaminazione della lettiera rappresenta la principale fonte di infezione. Il punto critico è nell'immediato post-mungitura o durante l'intervallo tra due mungiture. Per quanto riguarda i patogeni opportunisti, questi sono ospiti abituali della cute degli animali e hanno bisogno di fattori predisponenti come lesioni cutanee, mungitura impropria e/o disinfezione inadeguata al fine di ottenere l'accesso alla mammella.

Diversi studi sono stati eseguiti sull'eziologia delle mastiti nella specie bufalina. Studi precedenti in India (Chander e Baxi, 1975; Paranjabe e Das, 1986; Saini et al, 1994; Costa et al, 1997; Naiknaware et al, 1998) hanno valutato che gli Stafilocchi coagulasi negativi sono stati i batteri isolati più frequentemente, seguiti da *Corynebacterium* spp.,

Corynebacterium equi (Rahman e Baxi, 1983) e *Streptococcus* spp. Queste valutazioni concordavano con uno studio eseguito in Nili-Ravi sui bufali del Pakistan, (Jaffery e Rizvi, 1975) dove lo *S. aureus* era il microrganismo più importante responsabile di mastiti seguito da *Str. agalactiae*, *Str. Dysgalactiae* e *Str. uberis*. In Italia, in provincia di Salerno, Galiero et al, (1996) esaminarono 13 aziende agricole osservando che, per la maggior parte dei casi, lo *S. aureus* e lo *Str. agalactiae* erano responsabili dell'insorgenza di mastite, mentre lo *Str. dysgalactiae* sembrava avere un ruolo marginale.

In un altro studio, Costa et al. (1997) hanno valutato la presenza di mastiti in bufali Murrah nelle diverse fasi di lattazione e il principale agente isolato è stato lo *S. aureus* (45%), quindi *Corynebacterium* spp. (27%) e *Streptococcus* spp. (2%). Nello stesso paese, Guido et al. (2001) hanno verificato la presenza di mastiti in sette aziende agricole, isolando per lo più lo *Staphylococcus* (77%), di cui solo il 10% era positivo per coagulasi. Subito dopo il *Corynebacterium* Spp (12%), *E.coli* (5%), *Streptococcus* spp. (4%) e *Bacillus* spp. (1%).

Inoltre, Moroni et al. (2006) hanno esaminato 46 capi bufalini in lattazione di due allevamenti diversi, riscontrando che il microrganismo predominante è stato lo stafilococco coagulasi negativo (CNS), mentre

lo Streptococco rappresentava il 15%, di cui, per lo più Str. Uberis (80%).

L'isolamento del 77% dello Staphylococcus spp. è in accordo tra diversi autori di tutto il mondo (Chander e Baxi, 1975; Paranjabe e Das, 1986; Kapur et al., 1988; Saini et al., 1994; Costa et al., 1997; Naiknavare et al., 1998).

In Italia, in provincia di Latina, Zottola et al. (2005) hanno condotto uno studio su 10 aziende per verificare la presenza in questa zona di mastite nel bufalo. Nel 48,5% degli animali positivi, è stato isolato soltanto un ceppo batterico mentre nel 51,5% degli animali sono stati isolati più ceppi batterici. Il ceppo patogeno più frequentemente rilevato è stato lo Str. Uberis (34,3%), seguito da Str. agalactiae (21,5%), Str. dysgalactiae (0,8%) Aerococcus viridans (16%), Enterococcus faecalis (8,7%), Str. bovis (5%). Inoltre lieviti e muffe isolati per il 4,6%. CNS ha rappresentato l' 1,7% (xylosus, epidermidis, cromogeni).

Pitkala et al., (2004) hanno registrato una crescita microbica del 21-33% nei campioni di latte, mentre, Iqbal et al., (2004) hanno riportato solo il 15-16% di positività in bufale da latte, altre ricerche hanno riscontrato il 47% e il 43% di mastite in bufali Nili Ravi e Kundi. Queste variazioni significative possono essere dovute alla stagione, alla gestione aziendale,

alle condizioni di trasporto, alle differenze di trattamento del campione in laboratorio e all'uso di antibiotici (Khurshaid Anwar, 2013).

Dunque, una delle malattie più costose legate alla produzione di latte è la mastite, e anche se il bufalo è stato tradizionalmente considerato meno sensibile alla mastite rispetto ai bovini (Wanasinghe, 1985), alcuni ricercatori hanno dimostrato frequenze simili di mastite per ambedue le specie (Kalra, 1964; Badran, 1985; Bansal, 1995).

Oltre alla mastite clinica che può determinare ingenti perdite economiche, in termini di produzione, la mastite subclinica è ancora oggi un grave problema nell'azienda bufalina e merita attenzione per il suo potenziale impatto sul latte, sulla produzione dei prodotti lattiero-caseari e sulla sicurezza alimentare. Le mastiti subcliniche causano ben due terzi delle perdite della produzione totale di latte a causa dei danni riportati ai quarti colpiti (Radostits et al., 2007).

La maggior parte dei comuni patogeni isolati da latte mastitico sono altamente contagiosi.

Valutare l'incidenza e la prevalenza di mastiti subcliniche in allevamenti bufalini tenuti in condizioni manageriali apparentemente affidabili e la presenza di eventuali batteri patogeni in animali apparentemente sani è un dato importante e fondamentale ai fini preventivi.

CAPITOLO III

6. SCOPO DEL PROGETTO DI RICERCA

Lo scopo della ricerca condotta durante il Dottorato è stato quello di rilevare :

- a) La stagionalità dello stato sanitario della mammella nelle bufale sottoposte a controllo funzionale;
- b) La frequenza di isolamento, in base anche alla stagionalità, dei principali microrganismi isolati da latte di bufale clinicamente sane o con mastiti cliniche/subcliniche ed il tasso di resistenza degli stessi agli antimicrobici testati e di valutarne il trend in un periodo di 6 anni, dal 2010 al 2015;
- c) Il decorso e le modificazioni isto-patologiche in corso di mastiti da agenti specifici;

7. MATERIALI E METODI

7.1 Esperimento 1

Per l'espletamento della prima fase della sperimentazione è stata effettuata un'analisi statistica approfondita di una cospicua mole di dati ottenuti nel corso dei controlli funzionali del periodo sperimentale relativo a circa 700,000 campioni derivanti da circa 100,000 bufale sottoposte a controllo funzionale dall'associazione italiana allevatori negli ultimi 10 anni. In particolare nei soggetti utilizzati come casistica sono state valutate le produzioni e rilevati i dati relativi al conteggio delle cellule somatiche analizzati mediante Milkoscan.

7.2 Esperimento 2

L'indagine sperimentale è stata condotta su 3.585 campioni di latte, provenienti dalle diverse province campane, (di cui 1.745 con esito positivo). Prendendo spunto dall'esame batteriologico eseguito nel

laboratorio di Diagnostica dell'Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno Sez. di Salerno, con il presente lavoro si cerca di fare il punto sugli aspetti più problematici di questa procedura analitica; potendo così avere un quadro completo sull'evoluzione di questa patologia, nei sei anni considerati, sia dal punto di vista eziologico che della frequenza dei risultati ottenuti in relazione alla stagione.

Prelievo di latte e organizzazione dell'attività di laboratorio

I campioni di latte, una volta giunti al laboratorio, di norma entro le 24h dal prelievo, sono stati immediatamente seminati, in ragione di 20 (μ l), su cinque diversi terreni di coltura : trypticase soy agar with 5% sheep blood, MacConkey agar, Baird Parker agar, Prototheca isolation medium (PIM) e Mycoplasma agar. Quest'ultimo terreno selettivo per Micoplasma è stato incubato a 37°C in microaerofilia, tutti gli altri, invece, incubati a 37° in aerofilia per 24h, ad eccezione del terreno per la crescita di prototheca che restava in incubazione a 37°C per ben 72h.

Successivamente, si è proceduto all'isolamento delle colonie sospette e alla loro identificazione.

Le colonie con caratteristiche tipiche di germi patogeni responsabili di mastite, venivano sottoposte a colorazione di Gram, test della catalasi e dell'ossidasi. In particolare le colonie di Stafilococco spp. venivano

saggiate con plasma di coniglio per confermare la presenza di coagulasi (Fig. 6).

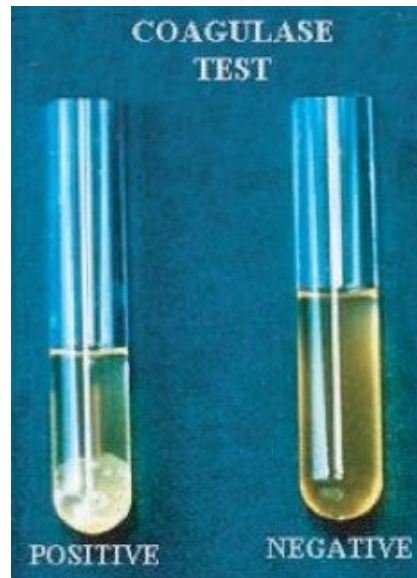


Figura 6. Il test della coagulasi è un metodo per distinguere i ceppi di *Staphylococcus* patogeno e i ceppi non patogeni. I batteri che producono questo enzima, la coagulasi, lo utilizzano come meccanismo di difesa. In presenza di un fattore plasmatico le coagulasi convertono il fibrinogeno in fibrina, coagulano l'area di plasma intorno ad essi, proteggendo così il batterio dalla fagocitosi. Il test è effettuato inoculando i batteri, in presenza di plasma (di coniglio), a 37°C per qualche ora, la formazione di un coagulo nella provetta indica la positività al test (Bulletin, 426/2008).

Le colonie sospette di *Streptococcus* spp. sono state sottoposte ad un test al lattice (Streptokit-BioMérieux) per la valutazione del gruppo di appartenenza secondo lo schema di Lancefield, i gruppi sierologici vengono contrassegnati con lettere dell'alfabeto.

La differenziazione antigenica si basa sulla presenza di un polisaccaride denominato sostanza C, che viene estratto dal soma batterico ed è gruppo

specifico. Il gruppo A comprende lo *Streptococcus Pyogenes*; il gruppo B comprende lo *Streptococcus agalactiae*; il gruppo C comprende lo *Streptococcus Dysgalactiae*, lo *Streptococcus equi*, lo *Streptococcus equisimilis*, lo *Streptococcus zooepidemicus*; il gruppo D comprende lo *Streptococcus suis* e lo *Streptococcus bovis*; il gruppo E comprende lo *Streptococcus porcinus*; il gruppo G comprende lo *Streptococcus canis*; infine lo *Streptococcus uberis* risulta non determinato. I ceppi sospetti di *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.* e *Bacillus cereus* venivano confermati con un sistema automatizzato di identificazione microbica che utilizza una tecnologia innovativa, il VITEK (BioMérieux).

I ceppi isolati sono stati saggiati per la sensibilità agli antibiotici su piastre di Mueller-Hinton, ad eccezione di quei batteri particolarmente esigenti, tipo lo *Streptococco spp.*, che necessitano di agar sangue; generalmente occorre 3 piastre per contenere tutti i dischetti impregnati di principio attivo da saggiare.

Una volta allestite, le piastre, sono state messe ad incubare a 37°C per 24h per poi eseguire la lettura degli aloni di inibizione seguendo le procedure da protocollo di laboratorio.

Gli antibiotici utilizzati relativi ai germi mastitogeni sono stati i seguenti: Amoxicillina (AML), Amoxicillina + Acido Clavulanico (AMC), Ampicillina (AMP), Cefacetrile + Rifaximina (41), Cefalexina (CL),

Cefapirina (CPR), Cefoperazone (CFP), Cefazoline (KZ), Cefquinome (CEQ), Ceftiofur (EFT), Cephalonium (CNM), Cloxacillina (OB), Enrofloxacin (ENR), Flumequina (UB), Gentamicina (CN), Kanamicina (K), Norfloxacin (NOR), Ossitetraciclina (OT), Oxacillina (OX), Penicillina (P), Rifaximina (RAX), Spiramicina (SP), Streptomicina (S), Sulphamethoxazole/Trimethoprim (SXT), Sulfonamide (S3), Tetraciclina (TE), Tiamfenicolo (TP), Tiamulina (TIA), Tilosina (TY).

La lettura è stata eseguita utilizzando il metodo di Kirby-Bauer (Fig. 7) che consiste nel misurare l'alone di inibizione di crescita che si manifesta intorno a ciascun dischetto imbibito a concentrazioni note di antibiotico. La crescita del batterio inibita dall'antibiotico è proporzionale alla concentrazione del farmaco. E' evidente che quanto più esteso risulta l'alone di inibizione intorno al dischetto, tanto più efficace risulta l'antibiotico.

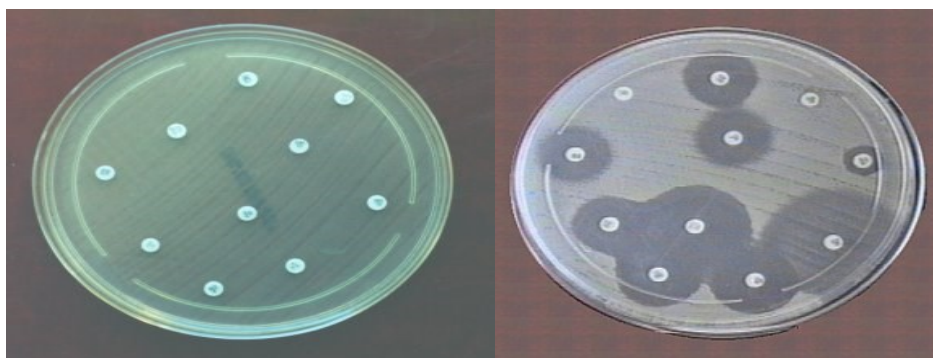


Figura 7. Allestimento antibiogramma secondo metodo di Kirby-Bauer: metodo per diffusione, si notino i diversi aloni di inibizione.

7.3 Esperimento 3

Allo scopo di valutare i danni alla mammella e i patogeni coinvolti in aziende che fanno registrare valori superiori ai 300,000 di cellule somatiche e senza anamnesi di mastiti clinicamente manifeste, sono stati effettuati in un'azienda sita in provincia di Foggia prelievi della ghiandola mammaria di 30 soggetti inviati al macello. La prova è stata espletata nei mesi di Febbraio, Maggio e Luglio 2015.

Le bufale sono state tutte regolarmente macellate e da ciascun quarto sono stati effettuati tamponi da destinare all'esame microbiologico. I tamponi sono stati processati per la ricerca dei seguenti microrganismi:

- **Contagiosi e zoonotici:** microrganismi in grado di moltiplicarsi a livello della cute e all'interno della mammella che ne diviene il serbatoio, ma con scarsa o nulla capacità di sopravvivere nell'ambiente. La trasmissione di tali agenti avviene quasi esclusivamente attraverso la mungitura che veicola, attraverso le mani del mungitore, il gruppo di mungitura, salviette o spugne non monouso, residui di latte contaminato da un soggetto infetto ad uno sano. Tra questi sono stati ricercati: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp.*, *Clostridi*, *Listeria*

spp., *Campylobacter spp.*

- **Ambientali:** microrganismi normalmente presenti nelle aree di allevamento (lettieria, attrezzature, deiezioni, acqua) che possono penetrare nella mammella in ogni momento del ciclo produttivo, compreso il periodo di asciutta durante il quale il rischio di infezione è molte volte più elevato che in lattazione. Tra questi sono stati ricercati: Streptococchi diversi da *S. agalactiae*, (*S. dysgalactiae*, *S. uberis*, Streptococchi fecali), *Staphylococcus spp.*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Prototheca spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas spp.*
- **Opportunisti:** Stafilococchi CNS.
- **Altri:** Muffe e lieviti.

L'isolamento è stato condotto utilizzando procedure operative interne redatte secondo le norme ISO, raccomandazioni OIE, rapporti ISTISAN. I tamponi sono stati inoculati in brodi di prearricchimento e arricchimento selettivo, in agar selettivi, differenziali e cromogenici. Le colonie isolate, ove necessario, sono state sottoposte a colorazione di Gram, a prove biochimiche ed enzimatiche (test della catalasi e dell'ossidasi, prova della coagulasi, idrolisi dell'esculina, CAMP-test, API system, RapID), a prove sierologiche (SAR) e a test di sensibilità agli antibiotici.

Per i ceppi patogeni isolati sono stati testati i seguenti antibiotici:

- Sulpha-Trimethoprim
- Ciprofloxacina
- Enrofloxacina
- Ceftazidime
- Cefalessina
- Doxiciclina
- Ossitetraciclina
- Optochina
- Bacitarcina
- Gentamicina
- Apramicina
- Streptomicina
- Amoxicillina
- Combination Disk (solo per *Klebsiella pneumoniae*).

Dai medesimi quarti, inoltre, dopo l'esame macroscopico anatomico-patologico, sono stati effettuati dei prelievi tissutali a livello di capezzolo, cisterna e dotti galattofori. Inoltre, per ciascun quarto, si è provveduto anche al prelievo del linfonodo sopramammario. I campioni sono stati in parte fissati in formalina neutra tamponata al 10%, in parte in fissativo Bowen e in parte congelati in isopentano immerso in azoto

liquido. I campioni sono stati routinariamente processati e le sezioni ottenute sono state colorate con metodica ematossilina-eosina per l'esame istologico. Le sezioni sono state successivamente sottoposte a metodica immunohistochimica e di immunofluorescenza per la tipizzazione degli infiltrati linfocitari utilizzando anticorpi monoclonali anti CD3,CD4,CD8,CD $\gamma\delta$,CD79,MHCII.

7.4 Analisi statistica

Al fine di valutare le differenze tra i mesi della diversa incidenza di soggetti con cellule somatiche elevate (esperimento 1) o tra le incidenze dei patogeni isolati dal latte e/o dalla mammella (esperimento 2 e 3) è stato utilizzato *test del Chi-quadro* per l'indipendenza delle variabili.

CAPITOLO IV

8. RISULTATI E DISCUSSIONE

8.1 Esperimento 1

Dall'elaborazione dei dati della popolazione bufalina sottoposta a controlli funzionali nel periodo sperimentale il primo dato interessante che è emerso riguarda la “destagionalizzazione”. Nella Figura 8 vengono, infatti, riportate la media della produzione giornaliera e la media dei giorni in lattazione di primipare e pluripare per mese di controllo. E' evidente che la maggiore produzione corrisponde alla minore distanza dal parto. Infatti i mesi in cui si registra la maggiore produzione e la minore distanza dal parto sono tra marzo e settembre per le pluripare e tra marzo e luglio per le primipare. Questo pattern sta ad indicare che mentre per le primipare l'inizio dei parti e la corrispondenza della produzione di latte con le esigenze di mercato risultano alquanto

sincrone, nelle pluripare, notoriamente più stagionali, gli allevatori per poter recuperare in fertilità ritardano l'epoca di interruzione della promiscuità sessuale con una coda di parti in tarda estate che è responsabile di una produzione di latte superiore alle richieste di mercato nel periodo autunno-inverno. Infatti dall'analisi della figura 8 si evidenzia chiaramente una netta caduta della produzione di latte nelle primipare già a partire da agosto-settembre, mentre nelle pluripare la riduzione del latte prodotto risulta meno drastica. Dalla Figura 8 si osserva, inoltre, anche che le primipare producono circa il 10% in meno delle pluripare.

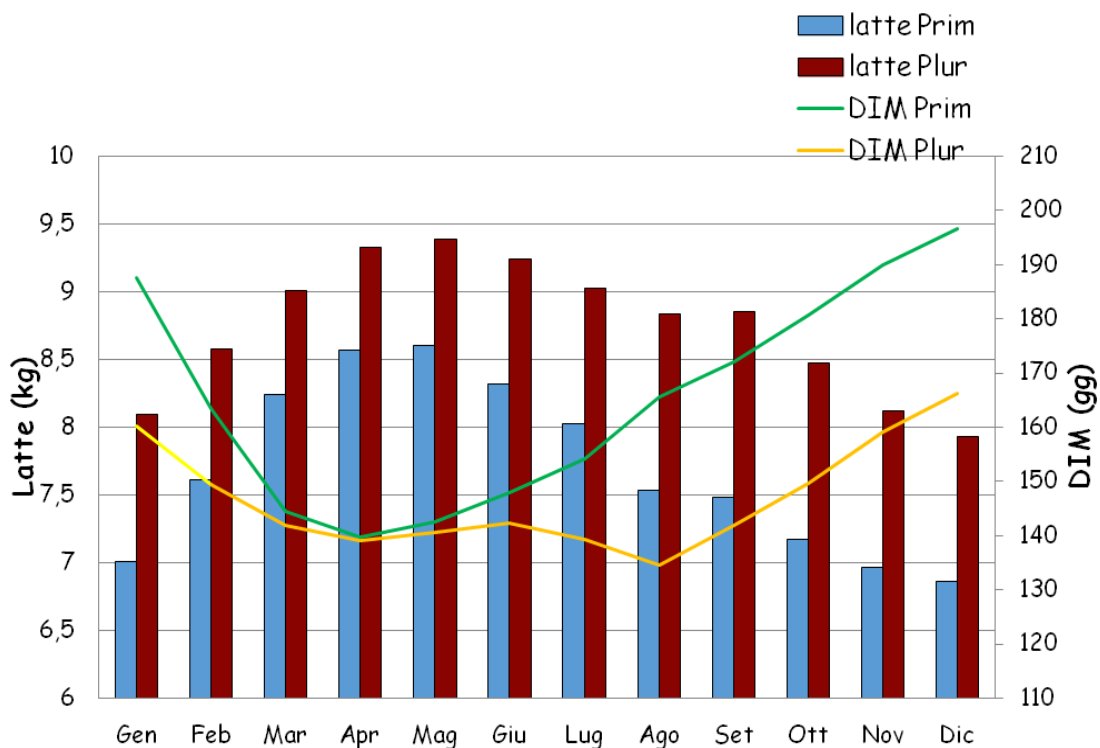


Figura 8. Produzioni medie di latte e distanza dal parto (DIM) nella popolazione sottoposta a controlli funzionali nel periodo sperimentale.

La produzione e la distanza dal parto condizionano un'altra problematica della filiera: è lo stato sanitario della mammella. Come si osserva dalla Figura 9, nei vari mesi di controllo in media le cellule somatiche si sono mantenute al di sotto del valore di 300,000, che è il limite imposto dal DM 882/2004 per il latte fresco di alta qualità. Un lieve aumento del tenore in cellule somatiche, anche se non statisticamente significativo, è stato possibile apprezzare a dicembre rispetto agli altri mesi dell'anno e ciò avviene per la concomitanza di soggetti a fine lattazione e all'esordio del parto, conseguenza della tecnica di destagionalizzazione adottata in questa specie. In ogni caso i livelli di cellule somatiche inferiori a 300,000 lascerebbero supporre uno stato sanitario della mammella nella specie bufalina ineccepibile e senza alcun potenziale pericolo di mastite.

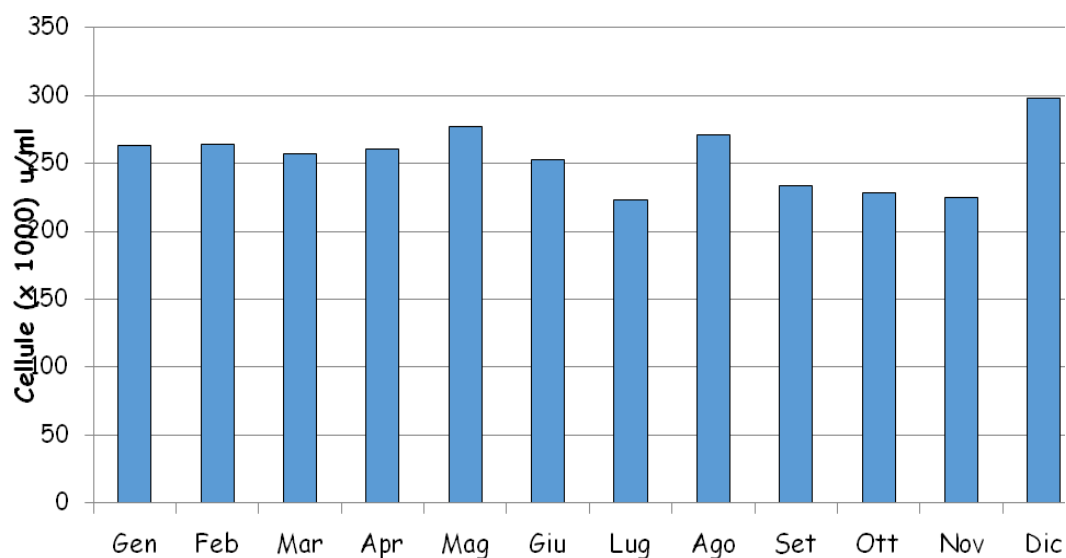


Figura 9. Media dei valori di cellule somatiche nel latte per mese di controllo

Tuttavia, come si evince dalla Figura 10 circa il 20% dei capi ha dato valori di cellule somatiche superiori a 300,000. Con un picco statisticamente significativo ($P < 0,01$) nei mesi di maggio e dicembre e precisamente in concomitanza dell'incremento dei parti specialmente delle primipare (Maggio) e dell'allungamento della distanza dal parto e dell'inizio dei parti (Dicembre).

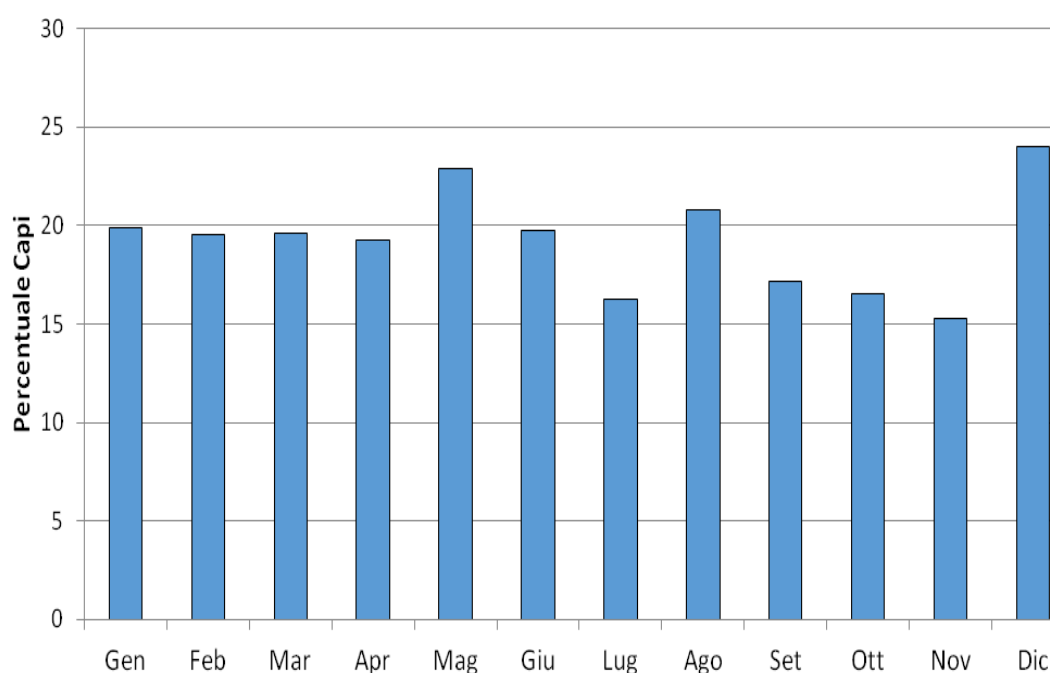


Figura 10. Percentuali di capi con valori di cellule somatiche superiori a 300,000

Se analizziamo la distribuzione dei capi per valore di cellule somatiche mostrata nella Figura 11, si evidenzia come il 10% dei soggetti ha fatto registrare valori di cellule somatiche superiori a 500,000. Questo significa che la mastite risulta una problematica evidente nella specie, ed in particolare le mastiti subdole, non clinicamente rilevabili, che però

comportano elevate perdite economiche. Ne consegue la necessità di porre maggiore attenzione alla gestione della sala di mungitura e all'igiene della mungitura, attuando piani di controllo per la rilevazione di agenti specifici al fine di programmare interventi di profilassi mirata. Ulteriore fattore che potrebbe essere alla base dell'elevata incidenza di soggetti con latte con elevato contenuto in cellule somatiche dovrebbe essere ascritto ad assenza di protocolli di mungitura idonei alla specie. Infatti, il numero delle pulsazioni, i tempi di mungitura e la pressione utilizzata è simile a quanto utilizzato nella specie bovina, notoriamente più produttiva e caratterizzata da una migliore mungibilità.

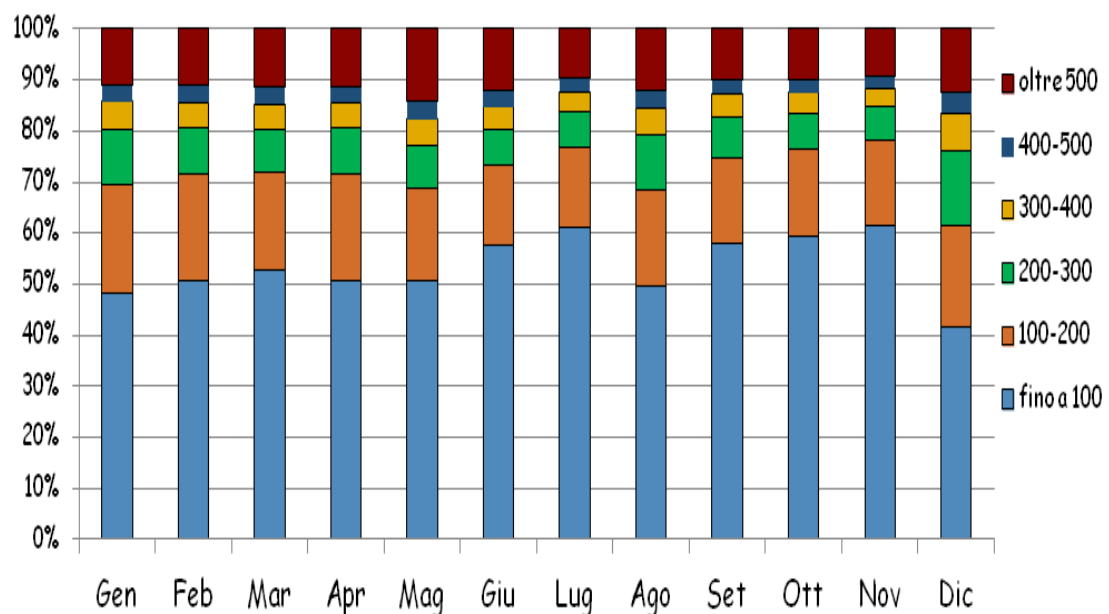


Figura 11. Distribuzione dei capi per valore di cellule somatiche

8.2 Esperimento 2

Come si può osservare dalla tabella 1 i batteri appartenenti al genere *Staphylococcus* sono tra i principali responsabili di mastiti nella specie bufalina. In particolare, lo *Staphylococcus aureus* ha registrato la percentuale più alta di isolamento, seguito dallo *Staphylococcus spp.* Da notare, inoltre, anche una percentuale interessante di isolamento dello *Streptococcus* Gruppo B, mentre a seguire, con incidenze più basse, ma non meno importanti in termini di patogenicità, abbiamo rilevato i seguenti ceppi (in ordine decrescente di isolamento): *Streptococcus* Gruppo C, *Streptococcus uberis*, *Arcanobacterium Pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. In generale i dati da noi registrati risultano in linea con quanto riportato in letteratura per la specie bufalina sia in Italia (Galiero et al., 1996; Moroni et al. 2006; Fraulo et al., 2009, e Pascale, 2009/2011) che in altri Paesi del mondo dove si allevano bufale (Chander e Baxi, 1975; Paranjabe e Das, 1986; Saini et al., 1994; Costa et al., 1997; Naiknaware et al., 1998), ma sono in contrasto con quanto riportato da Zottola et al., (2005) per la specie Mediterranea Italiana, in cui sono stati isolati principalmente streptococchi e tra questi il più frequente (34,3% degli isolamenti) lo

streptococcus uberis, germe ubiquitario e che viene isolato in corso di mastiti ambientali. Infatti nella nostra esperienza la stragrande maggioranza delle mastiti diagnosticate è da attribuire a patogeni specifici che pur favoriti da condizioni igieniche della mungitura non ottimali agiscono all'interno dell'allevamento in maniera subdola causando notevoli perdite produttive.

Staphylococcus aureus	22,1%
Staphylococcus spp.	18,8%
Streptococcus Gruppo B	7,4%
Streptococcus Gruppo C	1,3%
Streptococcus uberis	0,9%
Arcanobacterium Pyogenes	0,8%
Klebsiella pneumoniae	0,7%
Pseudomonas aeruginosa	0,1%

Dall'analisi della tabella 2 si evidenzia un progressivo e significativo aumento degli agenti mastitogeni isolati negli anni di sperimentazione con un picco nel 2013 e 2014. Analogo andamento è stato registrato per i principali agenti specifici isolati (tabella 2).

Tabella 2. Incidenza di mastitogeni negli anni 2010/2015				
	Tot mastitogeni	St. aureus	St. spp	Streptococco B, C e uberis
2010	35.22C 361/1025	14.83B 152/1025	14.14B 145/1025	6.14B 63/1025
2011	43.67BC 407/932	12.76B 119/932	22.32B 208/932	8.91B 83/932
2012	58.66AB 569/970	37.73A 366/970	15.26B 148/970	8.66B 84/970
2013	63.19A 91/144	31.94A 46/144	19.44B 28/144	20.14A 29/144
2014	67.83A 135/199	9.05B 18/199	44.72A 89/199	20.10A 40/199
2015	57.78AB 182/315	29.21A 92/315	18.10B 57/315	13.65AB 43/315

Lettere diverse all'interno della colonna indicano differenze significative per < P 0,01

Gli agenti responsabili di mastiti risultano isolati in misura minore nel periodo estivo in cui le elevate temperature e la minore piovosità predispongono maggiormente a mastiti di tipo ambientale e legate a cattiva mungitura (tabella 3). Del resto l'analisi della tabella 3 evidenzia, inoltre, un andamento dipendente dagli anni e probabilmente dalle condizioni microclimatiche registrate nelle diverse stagioni. E' interessante notare che negli anni 2012, 2013 e 2014 gli isolamenti di agenti specifici di mastiti in estate non sono risultati significativamente inferiori rispetto alle altre stagioni, ma da come è possibile rilevare dai

dati riportati in tabella 3 il risultato potrebbe essere stato inficiato dal minore conferimento di campioni in laboratorio probabile testimonianza di una riduzione dei casi di mastite nel territorio oggetto della prova, almeno per il 2013 e il 2014. Non è da escludere che la maggiore piovosità, che ha caratterizzato la stagione estiva in questi anni, abbia potuto rivestire un ruolo importante nella diffusione dei patogeni esaminati.

Tabella 3. Incidenza (%) e numerosità (n.) dei mastitogeni totali isolati negli anni in rapporto alle stagioni							
<i>Stagioni</i>	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Totale
INVERNO	60.75A 48/79	69.57A 176/253	42.83C 215/502	76.92AB 20/26	67.21 82/122	66.67A 4/6	55,20A 545/968
PRIMAVERA	38.66B 75/194	48.90B 133/272	69.56B 160/230	68.75B 44/64	80.00 4/5	50.50B 101/200	53,60A 517/965
ESTATE	21.91C 117/534	22.08C 34/154	73.85AB 48/65	87.50A 21/24	68.57 48/70	66.15A 43/65	34,10B 311/912
AUTUNNO	55.50A 121/218	25.29C 64/253	84.39A 146/173	20.00C 6/30	50.00 1/2	77.27A 34/44	51,70A 372/720

Lettere diverse all'interno della colonna indicano differenze significative per $P < 0,01$

8.3 Esperimento 3

Dall'analisi delle mammelle recuperate al macello è stato interessante notare che l'esame macroscopico non ha evidenziato alcun segno riferibile a mastite acuta. Soltanto in alcuni casi era visibile un ispessimento, localizzato in particolare a livello del capezzolo e dei dotti galattofori maggiori, dove era apprezzabile una consistente fibrosi. L'esame microbiologico ha rilevato la presenza di diversi microrganismi sia Gram positivi che Gram negativi dalle mammelle esaminate. Nello specifico, sono stati isolati batteri appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae ed, in particolare, 25/30 (83,3%) sono stati identificati come E. coli di cui 2/25 (8,0%) sono stati tipizzati come E. coli sierogruppo O114, 4/30 (13,3%) sono stati identificati come K. pneumoniae, 4/30 (13,3%) come Acinetobacter spp., 7/30 (23,3%) come Enterobacter spp. e 11/30 (36,7%) come Citrobacter spp.

Staphylococcus spp. è stato isolato nel 100% delle mammelle esaminate e, in oltre il 23% dei casi, (7/30), è stato possibile identificare lo S. aureus, batterio ampiamente riconosciuto come uno dei principali agenti mastitogeni sia nel bovino che nel bufalo. Altri agenti frequentemente isolati sono stati gli streptococchi (Streptococcus spp. è stato isolato nel

86,7% dei casi). Anche in questo caso è stata effettuata l'identificazione di specie, che ha consentito di evidenziare *S. bovis*, (11,5% dei casi), *S. agalactiae* (11,5%), *S. dysgalactiae* (3,6%), *S. viridans* (26,9%), *S. uberis* (26,9%) e *S. zooepidemicus* (19,2%). Inoltre, sono stati isolati 30/30 (100%) *Pseudomonas* spp. di cui 2/30 (6,7%) sono stati identificati come *P. aeruginosa*. I microrganismi anaerobi sono stati isolati in 3/30 (10%) delle mammelle analizzate e identificati come *Streptococcus constellatus* (n=1), *Peptococcus indolicus* (n=1), *Peptostreptococcus* spp. (n=1). *Mycoplasma* spp. è stato isolato da 18/30 (60,0%) delle mammelle esaminate. Infine *Listeria* spp. (non *monocytogenes*) è stata isolata da 11/30 (36,67%) delle mammelle esaminate.

Gli isolamenti inerenti *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Campylobacter* spp., *Prototheca* spp. e Clostridi sono risultati costantemente negativi. Le colonie sospette di *Mycoplasma* spp. saranno sottoposte a PCR per conferma ed identificazione di specie. I risultati delle analisi microbiologiche sono sintetizzati in Tabella 4.

Tabella 4. Microrganismi isolati da tamponi di mammelle bufaline e relativa incidenza.

Agente patogeno	Mammelle positive	
	(n)	(%)
<i>E. coli</i>	25/30	83,3
<i>E. coli O114</i>	2/25	8,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4/30	13,3
Altri Enterobatteri	22/30	73,3
<i>Acinetobacter</i> spp.	4/22	18,2
<i>Enterobacter</i> spp.	8/22	36,36
<i>Citrobacter</i> spp.	11/22	50,0
<i>Staphylococcus</i> spp.	30/30	100,0
<i>S. aureus</i>	7/30	23,3
<i>Streptococcus</i> spp.	26/30	86,7
<i>S. bovis</i>	3/26	11,5
<i>S. agalactiae</i>	3/26	11,5
<i>S. dysgalactiae</i>	1/26	3,8
<i>S. viridans</i>	7/26	26,9
<i>S. zooepidemicus</i>	5/26	19,2
<i>S. uberis</i>	7/26	26,9
Anaerobi	3/30	10,0
<i>Streptococcus constellatus</i>	1/3	33,3
<i>Peptococcus indolicus</i>	1/3	33,3
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	1/3	33,3
<i>Mycoplasma</i> spp.	7/30	23,3
<i>Pseudomonas</i> spp.	30/30	100,0
<i>P. aeruginosa</i>	2/30	6,7
<i>Listeria</i> spp.	11/30	36,67

L'esame istologico ha messo in evidenza in 18 delle 19 mammelle campionate nei prelievi di Febbraio e Maggio (94,5%), quadri di mastite che in 12 casi (63,2%) presentavano lesioni significative a livello di dotti

galattofori, ma soprattutto di interstizio e di capezzolo. In 10 delle 11 mammelle prelevate a Luglio (90,1%) sono state evidenziate marcate lesioni interstiziali caratterizzate da infiltrazioni linfoplasmacellulari e da fibrosi e lesioni capezzolari. Più precisamente, i dotti galattofori si presentavano ectasici ed interessati da un processo infiammatorio di tipo linfo-plasmacellulare. Macrofagi e granulociti neutrofili erano presenti nei lumi, all'interno dei quali si osservavano anche proiezioni papillari epiteliali (Figura 12a e 12b).

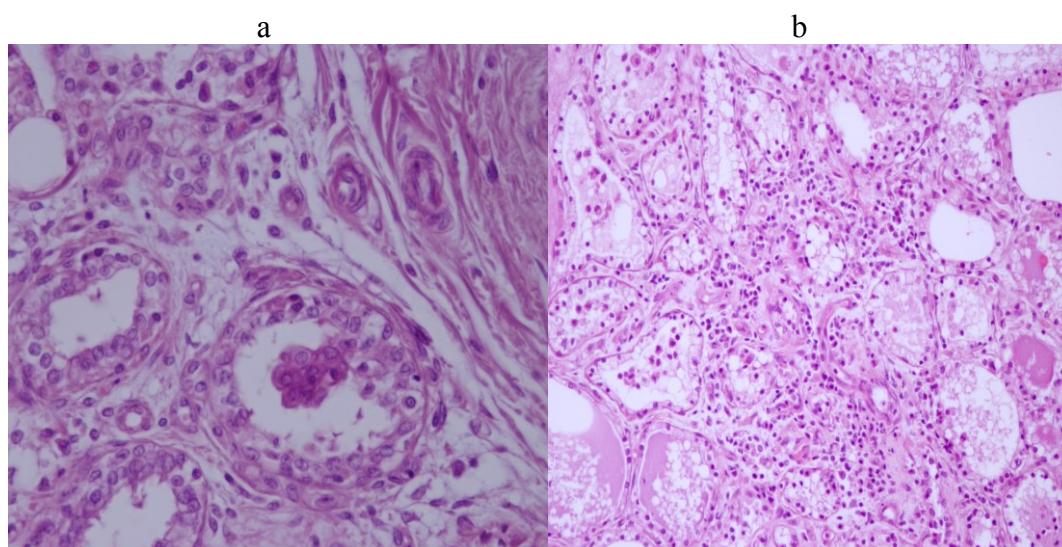


Figura 12. Lesioni anatomo-patologiche riscontrate a livello dei dotti galattofori. Da notare l'ectasia dei dotti stessi (a) e la presenza di un processo infiammatorio di tipo linfo-plasmacellulare. Macrofagi e granulociti neutrofili sono presenti nei lumi, all'interno dei quali si osservano anche proiezioni papillari epiteliali (b).

L'interstizio presentava un ispessimento fibro-connettivale, infiltrati infiammatori di tipo linfo-plasmacellulare che in 3 casi apparivano

organizzati in strutture simil-follicolari, riferibili a follicoli terziari, presenti fin sotto l'epitelio, a volte sollevandolo (Figura 13a e 13b).

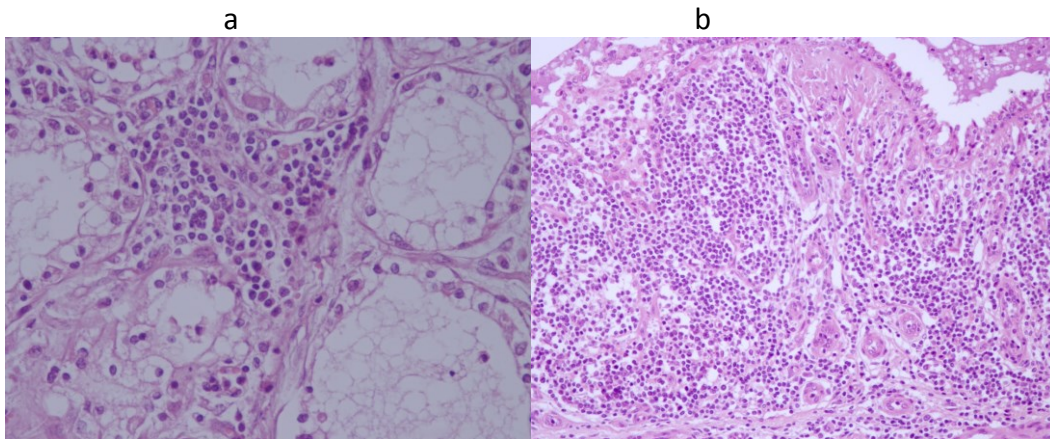


Figura 13. Lesioni anatomo-patologiche riscontrate a livello dell'interstizio della ghiandola mammaria. L'interstizio presenta un ispessimento fibro-connettivale (a), infiltrati infiammatori di tipo linfo-plasmacellulare che in 3 casi appaiono organizzati in strutture simil-follicolari, riferibili a follicoli terziari, che si spingono fin sotto l'epitelio a volte sollevandolo (b).

Nel capezzolo (Figura 14) e nel dotto papillare si sono osservati quadri di telite linfo-plasmocitaria e anche in tale sede sono state osservate aggregazioni linfoidi simil follicolari riferibili a follicoli terziari. Tali lesioni sono apparse decisamente più marcate nelle mammelle prelevate nel mese di Luglio.

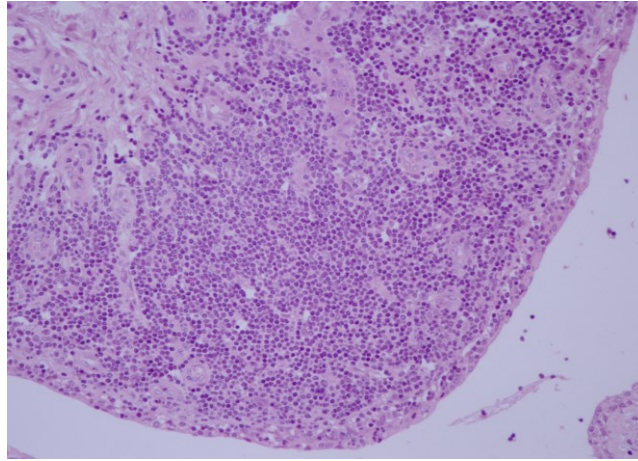


Figura 14. Lesioni anatomo-patologiche riscontrate a livello del capezzolo. Nel capezzolo e nel dotto papillare si osservano quadri di telite linfo-plasmocitaria e anche in tale sede si evidenziano aggregazioni linfoidi simil follicolari riferibili a follicoli terziari.

Le indagini di immunoistochimica e di immunofluorescenza, volte alla caratterizzazione dei linfociti, hanno evidenziato la presenza di linfociti CD8 positivi negli interstizi e anche nell'epitelio (Figura 15a, 15b e 15c).

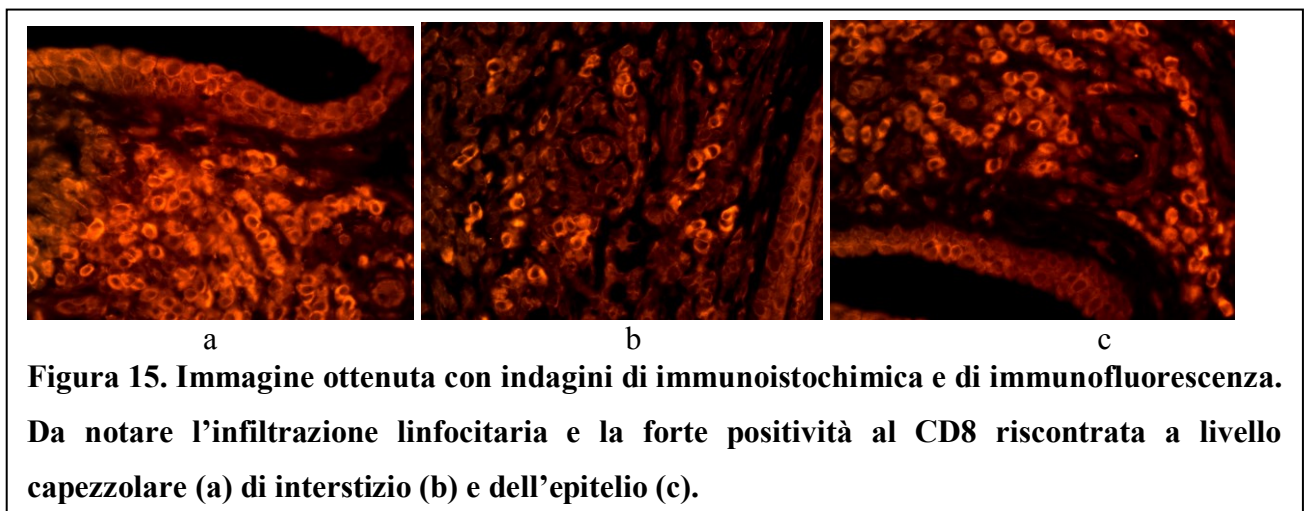
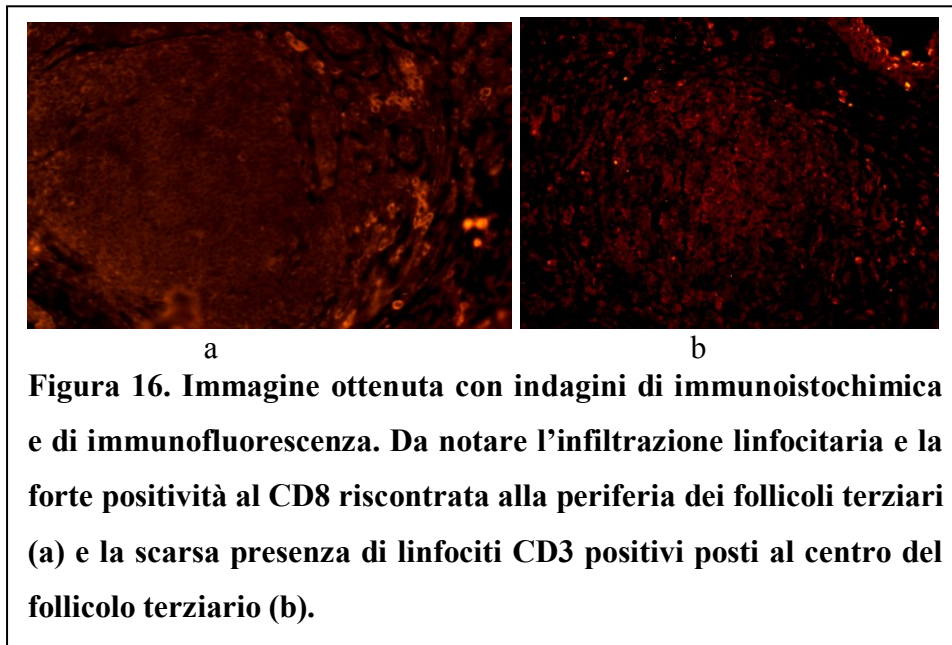


Figura 15. Immagine ottenuta con indagini di immunoistochimica e di immunofluorescenza. Da notare l'infiltrazione linfocitaria e la forte positività al CD8 riscontrata a livello capezzolare (a) di interstizio (b) e dell'epitelio (c).

Nell'ambito dei follicoli terziari i linfociti CD8 positivi si pongono alla periferia (Figura 16a), mentre pochi linfociti CD3 positivi sono posti al centro del follicolo terziario (Figura 16b).



Nei campioni prelevati nei mesi di Febbraio e Maggio è stata effettuata una valutazione quantitativa dell'infiltrato linfocitario e sono state provvisoriamente identificati 3 gradi di infiltrazione: scarso +; moderato ++; severo +++ (Tabella 5). Tali risultati appaiono correlati con il numero delle cellule somatiche e con l'isolamento microbiologico effettuato. Più precisamente, il confronto di questi primi dati istopatologici quantitativi con i dati microbiologici ottenuti ha evidenziato :

- una correlazione tra gravità delle lesioni istologiche e la presenza

di infezioni miste legate a diversi agenti patogeni;

- l'associazione tra presenza di follicoli terziari ed infezioni miste (*Klebsiella pneumoniae*, Streptococchi e *Staphylococcus aureus*) (Tabella 5).

Tabella 5. Isolamento microbiologico effettuato nelle mammelle delle bufale analizzate												
Nascita	Cell. som./ ml	Infiltrato infiammatorio	T L O	E. coli	Klebsiella	Altri Enterobatteri	Staph.	Strep.	Pseudomonas	Mycoplasma	Listeria	Altro
22/01/2008	506.000	+		P (C)		Acinetobacter (C)	CNS (C/D)			P		
07/02/2013	383.000	0		P (C)		Citrobacter (C)	CNS (C/D)			P		
17/07/2006	685.000	+		P (C/D)			CNS (C/D)			P		
28/06/2010	934.000	++	P	P (C/D/L)		Citrobacter (L)	CNS (C/D/L)			P		
11/05/2010	1.459.000	+++					CNS (D)			P		
29/04/2009	3.597.000	+++				Enterobacter (C)	CNS (C/D)	agalactiae (C)		P		
08/04/2007	509.000	++		P (C)			CNS (C/D)			P		
05/02/2006	1.560.000	+++		P (D)		Enterobacter (C)	CNS (D) Aureus (C)			P		
24/12/2004	296.000	0		P (C)	Pneumoniae (L)		CNS (C/D/L)		aeruginosa (D)	P		
21/07/2010		+++		P (D)			CNS (D)			P		
01/06/1994	1.888.000	+++		P VTEC (C/D)		Citrobacter (C)	CNS (C/D)	viridans (C)		P (D)		
14/10/2009	2.061.000	+++	P	P (C/D)	Pneumoniae (C)	Citrobacter (C)	CNS (C) Aureus (D/L)	agalactiae (C)	aeruginosa (C)	P (C/L)		
28/08/2006	1.103.000	+		P (C/D/L)		Citrobacter (D)/ Enterobacter (L) Acinetobacter (C)	CNS (C)			P (C/D/L)		Gemella Morbiliarum (D)
20/07/2010	651.000	++		P VTEC (C/L)		Citrobacter (D/L) Acinetobacter (C)	CNS (C/D/L)	viridans (C)				Peptococcus indolicus (C)
06/04/2007	370.000	+		P (C/D)		Enterobacter (C)	CNS (C)	viridans (D)		P (C/D)		Enterococcus avium (C)
15/10/2009	851.000	++		P (C/D/L)	Pneumoniae (C)	Citrobacter (D)	CNS (C/D/L)	bovis (D) constellatus (L)		P (C/L)		Peptococcus acidilactici (D)
10/03/2005	2.074.000	+++	P	P (C)	Pneumoniae (C)	Citrobacter (D) Acinetobacter (C)	CNS (C/D)	bovis (D)				Enterococcus avium (C)
Nascita	Cell. som./ ml	Infiltrato infiammatorio	T L O	E. coli	Klebsiella	Altri Enterobatteri	Staph.	Strep.	Pseudomonas	Mycoplasma	Listeria	Altro
01/09/2010	2.262.000	+		P (C/L)		Enterobacter (D)	CNS (C/D/L)	agalactiae (C/D)		P (C)		

07/12/2006	743.000	++		P (C)		Enterobacter (D)/ Citrobacter (C)	CNS (C/D)	viridans (C)		P (C/D)		
05/02/2006	116.000	+	P	P (C)			CNS (C/D)	uberis (D)		P	P	
11/07/2005	960.000	++	P	P (D/L)			CNS (C/D/L)	uberis (C/D) zooepidemicus (L)		P	P	
08/02/2007	578.000		P	P (C)		Enterobacter (L)	CNS (C/L)	uberis (C) viridans (L)		P	P	
16/03/2011	2.538.000	+++	P	P (C/L)			CNS (C/L)	viridans (D) zooepidemicus (L)		P	P	
18/02/2011	982.000	++	P			Enterobacter (D)	CNS (D/L) Aureus (C)	S. zooepidemicus (C/D/L)		P	P	
04/04/2008	1.608.000	++	P	P (C/D)			Aureus (C/D)	zooepidemicus (C)		P	P	
12/02/2011	119.000			P (C/D)			CNS (C/D) Aureus (L)	uberis (C/D/L)		P	P	
10/12/2008	1.342.000	+++	P			Citrobacter (C/D)	Aureus (C/D)	zooepidemicus (C) disgalactiae (D)		P	P	
28/09/2012		+		P		Citrobacter (D)	CNS (C/D/L)	uberis (C/D)		P	P	
02/09/2010				P		Citrobacter (D)	CNS (C) Aureus (D)	uberis (C/D)		P	P	
01/01/1990		++	P				CNS (C/D)	uberis (C/D) bovis (C/D)		P	P	
LEGENDA : P : presente; C: capezzolo; D: dotto; L: latte; CNS: stafilococchi coagulasi negativi												

Relativamente allo studio dei follicoli terziari, noti anche come organi linfoidi terziari (TLO), mai segnalati prima nella mammella di bufala, le indagini di immunoistochimica e di immunofluorescenza, hanno evidenziato una presenza di linfociti T CD8+ posti alla periferia del follicolo e di linfociti CD3 posti verso il centro. Il riscontro di tali strutture, soprattutto a livello di capezzolo, potrebbe permettere nuove ipotesi patogenetiche nel determinismo della mastite bufalina, utili anche per una eventuale gestione di tali patologie nell'ambito dell'allevamento. Va infatti considerato che gli antibiogrammi effettuati hanno evidenziato fenomeni di resistenza batterica (Figura 17) nei confronti di alcuni antibiotici testati, quali Streptomicina (*S. agalactiae*), Cefotaxime (*S. aureus*), Doxibicilina e Ossitetracicline (*P. aeruginosa*) e Amoxicillina (*K. Pneumoniae*).



Figura 17. Antibiotico resistenza osservata in vitro a diversi antibiotici.

9. CONCLUSIONI

Il capitolo mastiti rappresenta una delle principali patologie che interessa la specie bufalina. I dati riportati in questa tesi risultano alquanto allarmanti se ci riferiamo alla conta delle cellule somatiche. Infatti oltre il 20% dei campioni analizzati dall'intera popolazione sottoposta a controlli funzionali fanno registrare valori superiori a quelli definiti patologici per la bovina. Tale dato risulta ancora più allarmante se consideriamo che i valori di cellule somatiche indicativi di mastiti per la specie bufalina sono al di sotto di quanto riportato nella bovina. Inoltre, la constatazione che le mastiti in questa specie non sono sempre clinicamente manifeste e presentano un andamento cronico lascia intendere come la presente patologia, agendo in maniera subdola in allevamento, rappresenta la principale causa di perdita di redditività e rallentamento del miglioramento genetico. In molte aziende, infatti, l'aumento produttivo va perseguito eliminando i capi meno produttivi, tale pratica se da un lato riduce il diffondersi dei patogeni mammari in quanto favorisce l'eliminazione dei soggetti affetti da mastite cronica, dall'altro non favorisce l'esatta valutazione genetica dei capi allevati e

non permette l'utilizzo dei soggetti potenzialmente miglioratori per l'attività riproduttiva.

Non bisogna, inoltre, sottovalutare che l'incremento delle cellule somatiche e delle mastiti potrebbe essere legato a pratiche di mungitura non idonee per la bufala e che spesso volte vengono traslate da altre specie. Le caratteristiche anatomiche della mammella della bufala, nonché il rilascio di ossitocina, suggeriscono un approccio decisamente diverso nella mungitura di questa specie per cui sarebbe auspicabile in un prossimo futuro lo svolgimento di studi più appropriati per tale specie, sia relativamente alle tecniche di mungitura sia per l'approccio di tipo preventivo nei confronti di agenti che agendo in maniera subdola distruggono il tessuto mammario di secrezione e si diffondono in allevamento. In definitiva bisognerebbe porre maggiore attenzione ad una diagnosi precoce di flogosi mammaria e intervenire con strategie terapeutiche utili a ridurre il rischio mastite.

10. BIBLIOGRAFIA

Aguggini G., Beghelli V., Giulio L.F. 1992. Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. Utet-Torino.

Akers M.R., Lefcourt A.M. 1982. Milking and suckling induced secretion of oxytocin and prolactin in parturient cows. *Hormones & Behavior* 16:87-93.

Ali M.A., Ahmad M.D., Muhammad K., Anjum A.A. 2011. Prevalence of sub clinical mastitis in dairy buffaloes of Punjab, Pakistan, *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 21(3), Page: 477-480 ISSN: 1018-7081.

Aliev M.G. 1969. Physiology of milk ejection in buffaloes *Dairy Science Abstract* 31(12):677-680.

Aliev M.G. 1970. Physiology of machine milking of buffaloes. Dairy Sci. Abstr. 32:329–332.

Alim K.A., Barbari A., Badran A. 1977. Management trials on milking technique and concentrates feeding with local cattle and buffalo. World Rev. Anim. Prod. 13(2):27-32.

Alim K.A. 1982. Aspects of milking technique and productivity of udder quarters in buffalo. World Rev. Anim. Prod. 18(1):33-41.

Alim K.A. 1983. Repeatability of milking characteristics and udder traits in buffalo. World Rev. Anim. Prod. 19(2):13-41.

ANASB. A.N.A.S.B. Associazione Nazionale Allevatori Specie Bufalina. Tratto da www.anasb.it: <http://www.anasb.it/>.

Arrigoni N., C. Garbarino C., Franco A., Battisti A. 2014. Strumenti diagnostici e test di sensibilità agli antibiotici nell'approccio alla terapia della mastite bovina. Seminario Nazionale CONVEGNO SIVAR AGGIORNAMENTI IN BUIATRIA Cremona.

Badran A.E. 1985. Genetic and environmental effects on mastitis disease in Egyptian cows and buffaloes. *Indian J. Dairy Sci.* 38:230–234.

Bansal B.K., Singh K.A., Mohan R., Joshi D.V., Nauriyal D.C. 1995. Incidence of subclinical mastitis in some cow e buffalo herds in Punjab. *J. Res. Punjab Agric. Univ.*, 32:79–81.

Bar-Peled U., Maltz E., Brackental I., Folman Y., Kali Y., Gacitua H., Lehrer A.R. 1995. Relationship between frequent milking or suckling in early lactation and milk production of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78:2726-2736.

Bennet R.H., Christiansen K., Clifton-Hadley R.S. 1999. Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cows. *J. Dairy Res.* 66:1015-1027.

Bharadwaj A., Dixit V.B., Sethi R.K., Khanna S. 2007. Association of breed characteristics with milk production in Murrah buffaloes. *Indian Journal of Animal Science* 77: 1011 -1016.

Bhosrekar M.R., Nagpaul P.K. 1971. The types of udders and teats in some Indian milk breeds of cattle and buffaloes as compared to those of crossbreeds. *Indian J. Dairy Sci.* 24:208-211.

Bianchi A., Dal Sasso D., Manera C. 1985. “Piccoli caseifici per la produzione di formaggi a pasta filata”. *Genio rurale* N° 7-8, p. 35-46.

Bilek J., Zuda V. 1959. Thermoreceptors and contractility of smooth muscles of the mammary gland. Proc. XV International Dairy Congress 1:40.

Bittante G., Andrighetto I., Ramanzin M., 1997. Tecniche di produzione animale. 1: 55-58.

Bolzoni G., Benicchio S., Posante A., Boldini M., Peli M., Varisco G. 2006. Esame batteriologico del latte. Alcune considerazioni su esecuzione, interpretazione dei risultati e frequenza degli isolamenti. Large Animal Review, 12 (5): 3-11.

Borghese A. 2007. Personal communication.

Borghese A., Mazzi M., Rosati R., Boselli, C. 2007. Milk low pictures in Mediterranean Italian buffaloes through lactocorder instrument.

Bruckmaier R.M., Blum J.W. 1992. B-mode ultrasonography of the mammary glands of cows, goats and sheep during a- and b- adrenergic agonist and oxytocin administration. *J. Dairy Res.* 59:151-159.

Bruckmaier R.M., Schams D., Blum, J.W. 1993. Milk removal in familiar and unfamiliar surrounding: concentration of oxytocin, prolactin, cortisol and β -endorphin. *J. Dairy Res.* 60:449-456.

Bruckmaier R.M., Schams D., Blum J.W. 1994b. Continuously elevated concentrations of oxytocin during milking are necessary for complete milk removal in dairy cows. *J. Dairy Res.* 61:323-334.

Bruckmaier R.M., Hilger M. 2001. Milk ejection in dairy cows at different degrees of udder illing. *J. Dairy Res.* 63:369-376.

Bruckmaier R.M., Wellnitz O. 2014, Induction of milk ejection and milk removal in different production systems, *Veterinary Physiology*, Vetsuisse Faculty, University of Bern, Switzerland.

Bulletin of the International Dairy Federation 426/2008, Milking Management of Dairy Buffaloes.

Burton J.L., Erskine R.J. 2003 “Immunity and mastitis. *Vet. Clin. North America – Food Anim. Pract.* 19: 1-45.

Busani L., Graziani C., Franco A., Di Egidio A., Grifoni G., Formato G., Sala M., Binkin N. and Battisti, A. 2003. Gli antibiotici nell'allevamento bovino: risultati di un'indagine tra i veterinari del settore. *BEN-Notiziario ISS.* 16: 7-8.

Carvalho L.B., Amaral F.R., Brito M.A.V.P., Lange C.C., Brito J.R.F., Leite R.C. 2007. Contagem de células somáticas e isolamento de

agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*) Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.59 no.1 Belo Horizonte Feb.

Chander S., Baxi K.K. 1975. Note on diagnosis and treatment of subclinical mastitis in buffaloes. Indian Vet. J. 52:847-849.

Cockrill W.R. 1974. Management conservation and use. In: The husbandry and health of the domestic buffalo. (Ed. WR Cockrill). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome:276-312.

Consorzio Nazionale per la tutela del formaggio Mozzarella di Bufala, Consorzio di tutela MBC. 2008. www.mozzarelladop.it/

Costa E.O., Garino F., Watanabe Jr., E.T., Ribeiro A.R., Vezon P., Baruselli P.S., Paske, A. 1997. Study of mastitis among ten dairy buffaloes herds ((*Bubalus bubalis*) in the Vale do Ribeira (Ribeira River

Valley) São Paulo. Brazil. Proc. 5th World Buffalo Congr., Caserta, Italy.

Costa D.A., Reinemann D.J. 2004. The purpose of the milking routine and comparative physiology of milk removal. Proc. National Mastitis Council Ann. Meet. 43:189-197.

Dash P.C., Basu S.B., Sharma K.N.S. 1976. Effect of frequency of milking in Murrah buffaloes. Indian J. Dairy Sci. 29:113-116.

Degano L. 2005. Un nuovo modello per la valutazione genetica per la mungibilità. Pezzata rossa Marzo 17-19.

Dewhurst R.J, Knight C.H. 1994. Relationship between milk storage characteristics and the short term response of the dairy cow to thrice daily milking. Anim. Prod. 58:181-187.

Dhakal I.P., Kapur M.P., Bhardwaj R.M. 1991. Diagnosis of subclinical mastitis in buffaloes using somatic and viable cell counts. *Indian J. Dairy Sci.* 44:585-586.

Dhakal, I.P. 2006. Normal somatic cell count and subclinical mastitis in Murrah buffaloes. *J. Vet. Med.*, **B(53)**: 81-86.

El-Ghousien, S.S., Ashour, G., Shaie, M.M., Badreldin, A.L. 2002. Comparative study of the udder structure in buffaloes and cattle: 1-morphological and anatomical characteristics of the mammary tissue. Book of Abstracts of the 53rd annual meeting of the European association of animal production, Book of abstracts, No.8 Cairo, Egypt 1-4 September 2002:186.

Fraulo et al, 2009 ; Pascale, 2009/2011. *La Settimana Veterinaria* - N°746 - 29 giugno 2011.

Frigo E., Pedron O. Così si valuta il flusso di latte dai quarti. *Informatore zootecnico*, dossier qualità latte (2008); 9:45-49.

Gajbhiye A.R., Wanjari B.V., Chavan M.S., Jadhao S.G., Sahare T.Y. 2007. Udder measurements and its correlation with milk productivity in crossbred cattle. *Indian Journal of Field Veterinarians* 3: 39-40.

Galiero G., Morena, C. 2000. The meaning of the Somatic Cell Count in buffalo milk. *Bubalus bubalis* IV:26-27.

Galiero G., Palladino M., Lai O., Goffredi, C.G. 1996. Buffaloes mastitis: bacteria identification and susceptibility to antimicrobial drugs. *Bubalus Bubalis* II:61-66.

Galton D.M., Petersson L.G., Merrill W.G. 1986. Effects of pre-milking udder preparation practices on bacterial counts in milk and on teats. *J Dairy Sci* 69, 260–266.

Galton DM. 2004. Effects of an automatic post-milking teat dipping system on new intramammary infections and iodine in milk. *Journal of Dairy Science* 87, 225–31.

Gangwar, P.C. 1976. The effect of stage of lactation on let-down time, milking time, milk yield average low rate and milk composition in buffaloes. *Indian J. Nutr. Diets* 13:252-261.

Grindal R.J., Bramley A.J. 1989. Effect of udder preparation on transmission of *Staphylococcus aureus* while milking with a multi-valved cluster. *J Dairy Res* 56, 683–690.

Guarda F., Mandelli G. 2002. *Trattato di anatomia patologica veterinaria*. Utet, III Edizione.

Guarino A. 1994. Valutazione quali-quantitativa delle cellule presenti nel latte di bufala, Atti della Societa italiana delle scienze veterinarie, Volume XLVI.

Guido M.C., Carvalho N.A.T., Baruselli P.S., Costa E.O. 2001. Female bubaline mastitis aetiology in Brazilian state of São Paulo. Atti I Congr. Nazionale sull'Allevamento del Bufalo, Eboli (Sa), Italy:417-419.

Harmon R.J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. J. Dairy Sci. 77:2103-2112.

Henderson A.J., Blatchford D.R., Peaker M. 1983. The effect of milking thrice instead of twice daily on milk secretion in the goat. Q. J. Exp. Physiol. 68:645-652.

Hillerton J.E., Shearn M.F.H., Teverson R.M., Langridge S., Booth J.M. 1993. Effect of pre-milking teat dipping on clinical mastitis on dairy farms in England. *J. Dairy Res.* 60:31-41.

Hogberg M.S., Lind O. 2003. Milking the Buffalo. Chapter 6 in Buffalo milk production. www.milkproduction.com.

Huijps K., Lam T.J., Hogeveen H. 2008. Costs of mastitis: facts and perception. *Journal of Dairy Research* 75(01):113-120.

Iqbal M., Khan M.A., Daraz B., Siddique U. 2004. Bacteriology of mastitic milk and in vitro antibiogram of the isolates. *Pakistan Vet. J.*, 24(4):1098-1134.

International Dairy Federation 1987. Bovine Mastitis Definitions and Guidelines for Diagnosis, vol. 211. International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 3-8.

ISO 5707, 2007. Milking machine installations – Construction and performance. International Standard Organisation, Geneva, Switzerland, 56 pp.

Jaffery M.S., Rizvi A.R. 1975. Aetiology of mastitis in Nili-Ravi buffaloes of Pakistan. *Acta Trop.* 32:75-78.

Jingar S.C., Mehla R.K., Singh M. 2014. Climatic effects on occurrence of clinical mastitis in different breeds of cows and buffaloes. *Arch. Zootec.* 63 (243): 473-482.

Kalra D.S., Dhanda M.R. 1964. Incidence of mastitis in cows and buffaloes in North West India. *Vet. Rec.*, 76:219–222.

Kapur M.P., Sharma A., Bhardway R.M. 1988. Bacteriology of clinical mastitis in buffaloes. *Proc. World Buffalo Congr. New Delhi, India* 4:44-47.

Karch G., Worstorff H., Prediger A. 1989. Zur Milchgabe von Kuhen nach Vibrationsstimulation mit abgestuften Pulszahlen. *Milchwissenschaft* 44:13-16.

Khurshaid A., Yasir A., Muhammad M. 2013. Prevalence And Bacteriology Of Sub Clinical Mastitis In Buffaloes In And Around Peshawar District, Khyber Pakhtunkhwa Pakistan. *International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)* Vol. 2 Issue 7.

Knight C.H. 2001. A vision of dairy production in the UK. *British Society of Animal Science, Occasional publication* 28, 51-57.

Krishnaswamy S., Vedanayaham A.R., Varma K. 1965. Studies on mastitis in cattle. *Indian Vet. J.* 42:92-103.

L'informatore Agrario: pag. 3-4-5. Tutte le informazioni per una corretta mungitura, 18-2006.

Lin C.Y., Lee A.J., McAllister A.J., Batra T.R., Roy G.L., Vesely J.A., Wauthy J.M., Winter K.A. 1987. Intercorrelations Among Milk Production Traits and Body and Udder Measurements in Holstein Heifers. *Journal of Dairy Science* 70: 2385–2393 <http://jds.fass.org/cgi/reprint/70/11/2385.pdf>.

Ludri R.S. 1985. Comparison of three times milking to two times milking in Murrah Buffaloes. *Indian J. Anim. Sci.* 19:29-32.

Ma Y., Ryan C., Barbano D.M., Galton D.M., Rudan M.A., Boor K.J. 2000. “Effects of somatic cell counts on quality and shelf life of pasteurized fluid milk”. *J. Dairy Res.* 83:264- 274.

Magnusson M., Christiansson A., Svensson B., Kolstrup, C. 2006. Effect of different premilking manual teat-cleaning methods on bacterial spores in milk. *J Dairy Sci* 89, 3866–3875.

Mallardo K., Nizza S., Fiorito F., Pagnini U., De Martino L. 2013. Asian Pac J Trop Biomed. Mar; 3(3):169-73. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60044-1. A comparative evaluation of methicillin-resistant staphylococci isolated from harness racing-horses, breeding mares and riding-horses in Italy.

Marathe M.R., Whittlestone W.G. 1958. The machine milking characteristics of water buffaloes. Indian J. Dairy Sci. 11:59-66.

Mariani G., Nocetti M., Vecchia P. 2004. Le buone pratiche gestionali che aiutano a controllare le mastiti. *L'informatore Agrario*, 60(39) 43-48.

Mastitis Council Italia, 2006. Tutte le indicazioni per una corretta mungitura. *L'informatore Agrario*.18/2006.

Mayer H., Schams D., Worstorff H., Prokopp A. 1984. Secretion of oxytocin and milkremoval as affected by milking cows with and without manual stimulation. *J. Endocrinol.* 103:255-261.

Miller G.Y., Dorn C.R. 1990. Costs of dairy cattle diseases to producers in Ohio. *Prev. Vet. Med.* 8:171-182.

Miller G.Y., Bartlett P.C., Lance S.E., Anderson J., Heider L.E. 1993. Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202:1230-1236.

Milner P., Page K.L., Hillerton J.E. 1997. The effects of early antibiotic treatment following diagnosis of mastitis detected by a change in electrical conductivity of milk. *J. Dairy Sci.*, **80**: 859-863.

Monetti P.G. 2001. I bovini: produzione del latte. *Allevamento dei bovini e dei suini.* 1:112-117.

Moroni P., Sgoifo Rossi C., Pisoni G., Bronzo V., Castiglioni B., Boettcher P.J. 2006. Relationship between somatic cell count and intramammary infection in buffaloes. *J. Dairy Sci.* 89:998-1003.

Naiknaware H.S., Shelke D.D., Bhalerao D.P., Keskar D.V., Jagadesh S., Sharma L.K. 1998. Prevalence of subclinical mastitis in buffaloes in and around Mumbai. *Indian Vet. J.* 75:291-292.

Natale A. 2013. “Mozzarella di Bufala: si apre una nuova stagione”. *Ambiente e Management. Ruminantia mensile.*

Natzke R.P., Everett R.W., Guthrie R.S., Keown J.F., Meek A.M., Merrill W.G., Roberts S.J., Schmidt G.H. 1972. Mastitis control programs: effect on milk production. *J. Dairy Sci.* 55:1256–1260.

Nickerson S.C. 1992. Anatomy and physiology of the udder. In: Machine milking and lactation. (eds) A.J. Bramley, F.H. Dodd, G.A. Mein, & J.A. Bramley. Insight Books, Newbury, England. pp. 37-68.

Oliver S.P., Lewis M.J., Ingle T.L., Gillespie R.E., Matthews K.R., Dowlen H.H. 1993. Pre-milking teat disinfection for the prevention of environmental pathogen intramammary infections. J Food Prot 56, 852–855.

Orlandini S., Catta M., Miarelli M., Lattanzi L. 2007. Metodi di routine per la determinazione delle cellule somatiche nel latte di bufala. Citometria di flusso & CCD camera. Convegno “Caratteristiche igienico – sanitarie del latte bufalino, ovino e caprino Risultati di ricerche condotte nella Regione Lazio”. Viterbo - 5 Ottobre.

Pankey J.W., Eberhard R.J., Cuming A.L., Daggett R.D., Farnsworth R.J., McDuff C.K. 1984. Update on post milking teat antisepsis. J. Dairy Sci. 67:1336–1353.

Paranjabe V.L., Das A.M. 1986. Mastitis among buffalo population of Bombay. A bacteriological report. Indian Vet. J. 63:438-441.

Pathak N.N. 1992. Behaviour and training of river buffaloes. In: Buffalo production, production-system approach. Eds., Tulloh, N. M., Holmes J, H, G., World Animal Science, c6., Elsevier, Amsterdam, the Netherlands:223–231.

Piccinini R., Miarelli M., Ferri B., Tripaldi C., Belotti M., Daprà V., Orlandini S., Zecconi A. 2006. Relationship between cellular and whey components in buffalo milk. J. Dairy Res. 73:129-133.

Pitkala A., Haveri M., Pyorala S., Myllys V., Buzalski T.H. 2004. Bovine Mastitis in Finland, Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. J. Dairy Sci., 87: 2433-2441.

Prasad R.M.V., Sudhakar K., Raghava Rao E., Ramesh Gupta B., Mahender M. 2010. Studies on the udder and teat morphology and their relationship with milk yield in Murrah buffaloes. NTR College of Veterinary Science, Gannavaram A.P India 521102.

Purohit G.N., Gaur M., Shekher C. 2014. Mammary gland pathologies in the parturient buffalo. Asian Pacific Journal of Reproduction, 3(4) :322-336.

Radostits O.R., Blood D.C., Gay C.C. 2007. Mastitis. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats, 9 th Edn., Bailer tindall, London, pp: 563-614.

Ragab M.T. 1975. Brief notes on mechanization of dairy farms in the A.R. Egypt. Beiträge Trop. Landwirtschaft. Veterinärmed. 13H:185-187.

Rahman H., Baxi K.K. 1983. *Corynebacterium equi* in mastitis in a buffalo. *Vet. Rec.* 13:167.

Ramasamy M., Singh M. 2004. Postpartum milking behaviour and its effect on milk production in Murrah buffaloes (*bubalus bubalis*). *Indian J. Anim. Sci.*, 74 (5) : 530-533.

Ranucci S., Valente C., Tesei B., Fruganti C., Mangili V., Boni M. 1988. Sanitary control of sheep udder: total and differential cell counts in milk. *Atti S.I.P.A.O.C.*, 8:81-98.

Rasmussen M.D., Galton D.M., Paterson L.G. 1991. Effects of pre-milking teat preparation on spores of anaerobes, bacteria and iodine residues in milk. *J Dairy Sci* 74, 2472–2478.

Reichmuth J. 1975. Somatic cell counting-interpretation of result. *Bulletin FIL-IDF* 85:93-109.

Rich M., Roberts L. 2004. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from companion animals. *Vet Rec* 154:310.

Ricci A., Vio D., Zavagnin P. 2003. Monitoraggio dell'antibioticoresistenza in batteri zoonotici e commensali isolati da bovini al momento della macellazione. *Atti della Società Italiana di Buiatria*. 35: 59-66.

Sagi R., Gorewit R.C., Zinn S.A. 1980b. Milk ejection in cows mechanically stimulated during late lactation. *J. Dairy Sci.*:1957–1960.

Saini S.S., Sharma J.K., Kwatra M.S. 1994. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis among crossbreed cows and buffalos in Punjab. *Indian J. Dairy Sci.* 47:103-107.

Sandholm M.T., Honkanen-Buzalski L., Kartiinen Pyöröla S. (ed.). 1995. The Bovine udder and mastitis. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Helsinki, Finland, 312 pp.

Santillo A., Ruggeri D., Albenzio M. 2011. Caratterizzazione chimica, enzimatica e microbiologica del latte e della mozzarella di bufala prodotti in provincia di Foggia. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 62 (5), 377-386.

Sastry N.S.R. 1983. Monograph: Buffalo Husbandry; Constraints to successful buffalo farming and overcoming the same through management. Institute of Animal Management and Breeding, University of Hohenheim, Germany, Discipline – Milk Production:4-6.

Sastry N.S.R., Bhagat S.S., Bharadwaj A. 1988. Aspects to be considered in milking management of buffaloes. *Indian J. Anim. Prod. Man.* 4:378-393.

Sastry N.S.R., Tripathi V.N. 1998. Modern management innovations for optimising buffalo production. Buffalo production and health, A compendium of latest research information based on Indian studies. 2nd World Buffalo congress, New Delhi 1988, Indian Council of Agricultural Research, New Delhi:38-62.

Saxena H.K. 1973. Variation in shape and size of teats in Murrah buffaloes. *Indian Vet. J.* 51(1):669-675.

Shailja, Singh M. 2002. Post milking teat dip effect on somatic cell count, milk production and composition in cows and buffaloes. *Asian-Australasian J. Animal Sciences*, 15(10): 1517-1522.

Sharif A., Ahmad T., Bilal M.Q, Yousaf A., Muhammad G., Rehman S.U., Pansota F.M. 2007. Estimation of milk lactose and somatic cells for the diagnosis of sub-clinical mastitis in dairy buffaloes. *Int. J. agric. Biol.*, **9**: 267-270.

Sharif A., Muhammad G., Muhammad A. Sharif. 2009. Mastitis in Buffaloes. Pakistan J. Zool. Suppl. Ser., No.9, pp. 479-490.

Silva T.D., Silva K.F.S.T. 1994. Total and differential cell counts in buffalo milk. Buffalo J. 2:133-137.

Singh P.J., Singh K.B. 1993. A study on economic losses due to mastitis in India. Indian J. Dairy Sci. 47(4):265–272.

Skrzypek R., Wojtowski J., Farh R.D. 2004. Effects of various methods of udder and teat preparation for milking on the hygienic quality of milk. Med Weter 60, 1002–1005.

Smith K.I. 2002. A discussion of normal and abnormal milk based on somatic cell counts and clinical mastitis. Bulletin FIL-IDF 372:43-45.

Sollecito N.V., Lopes L.B., Leite R.C. 2011. Somatic cell count, profile of antimicrobial sensitivity and microorganism isolated from buffalo mastitis : a brief review. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 33(1):18-22.

Tanhuanpää E. 1995. Anatomy and physiology. In: Sandholm M., Honkanen-Buzalski T.,

Thomas S.P., Anantakrishnan C.P. 1949. Investigations on machine milking. *Indian J. Dairy Sci.* 2:70-76.

Thomas C.S., Svennersten-Sjaunja K., Bhosrekar M.R., Bruckmaier R.M. 2004. Mammary cisternal size, cisternal milk and milk ejection in Murrah buffaloes. *J. Dairy Res.* 71:162-168.

Thomas C.S., Bruckmaier R.M., Ostensson K., Svennersten-Sjaunja K. 2005. Effect of different milking routines on milking-related release of

the hormones oxytocin, prolactin and cortisol, and on milk yield and milking performance in Murrah buffaloes. J. Dairy Res. 72:10-18.

Uppal S.K., Singh K.B., Roy K.S., Nuriyal D.S., Bansal B.K. 1994. Natural defence mechanism against mastitis: A comparative histomorphology of buffalo teat canal. Buffalo J. 2:125-131.

Varma A.K., Sastry N.S.R. 1994. Milking management of murrah buffaloes followed in rural India. In: Proceedings of the 4th world buffalo congress, Vol-II Sao Paulo, Brazil 1994.

Zecconi A. 2002. Mastitis Council Italia. <http://users.unimi.it/mcitalia>.

Zecconi A., Casirani G., Binda E., Belotti M., Piccinini R. 2004. Quaderni della Ricerca. Aprile. N.30. Robot di mungitura: sanità della mammella.

Zecconi A., Zanirato G. 2013. Il controllo delle mastiti per un allevamento sostenibile.

Zicarelli, L. 2004. Il latte di bufala: caratteristiche, resa al caseificio e produzione di mozzarella. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 55:167-178.

Zottola T., Briganti P., Cuoco E., Guzzon L., Silvestre C., Condoleo R.U., Parisella P. 2005. Atti del III Congresso Nazionale dell'Allevamento del Bufalo. Capaccio-Paestum (Sa).

Wanasinghe D.D. 1985. Mastitis among buffalos in Sri Lanka. *Proc. First World Buffalo Congr. Cairo, Egypt* 4:1331-1333.

Weiss D., Weinfurtner M., Bruckmaier R.M. 2004. Teat Anatomy and its Relationship with Quarter and Udder Milk Flow Characteristics in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 87:3280-3289.

Williamson J.H., Lacy-Hulbert S.J. 2010. Effect of post milking teat spraying on mastitis, SCC and teat skin abnormalities in five Waikato dairy herds. Proceedings of the 5th IDF Mastitis Conference Pp. 665.

Worstorff H., Schams D., Prediger A., Auernhammer H. 1980. Zur Bedeutung der Stimulation beim Melken. Milchwissenschaft 35(3):141-144.

Ringraziamenti

Eccomi al termine di questo importante percorso, il " Dottorato". E' difficile in poche righe ricordare tutte le persone che hanno contribuito a rendere "migliori" questi ultimi tre anni. Desidero ringraziare tutti coloro che, a vario titolo, mi hanno accompagnato in questa avventura e senza i quali questo lavoro di tesi non si sarebbe potuto realizzare.

La prima persona importante da ringraziare è il mio fantastico "TUTOR", il Prof. Giuseppe Campanile, non solo per aver guidato il mio percorso scientifico con esperienza e bravura, ma soprattutto per essere più volte andato al di là dei compiti di "docente guida" mostrandosi disponibile ed incoraggiandomi sempre, quasi come una figura "paterna", divenendo così un punto di riferimento nella mia vita.

Grazie all'esperienza vissuta all'Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno, sez. di Salerno, ho incontrato molte persone meravigliose, ma la mia attenzione va, in particolar modo, alla Dott.ssa Ester De Carlo, DONNA che ammiro per la sua eccezionale preparazione professionale e per la sua caparbia, tale da trasmettermi grinta e farmi appassionare ancor di più al mio lavoro, ed anche al Dott. Domenico Vecchio, per avermi guidato con la sua esperienza nel percorso

complesso della stesura della mia tesi dimostrandosi “amico” e soprattutto disponibile a fornirmi utili consigli e spiegazioni (anche di domenica) nello sviluppo del mio lavoro. Un GRAZIE va anche al Dott. Fraulo sempre comprensibile e presente in ogni mio momento di difficoltà.

Non posso poi non ringraziare i tecnici del laboratorio di Diagnostica, (in particolar modo la Dott.ssa Annarita Scognamiglio, oramai mia amica sincera), con i quali ho lavorato in questi tre anni quotidianamente tra scontri e confronti costruttivi.

Desidero inoltre ringraziare con tutto il mio cuore, la cara Prof.ssa Luisa De Martino, mia guida formativa in tutti questi anni, con la quale ho condiviso momenti di gioia e momenti tristi, e che sarà per me sempre un riferimento costante in qualsiasi scelta professionale che accompagnerà il mio percorso di vita.

Ringrazio con immenso affetto, il Prof. Pagnini, la Prof.ssa Montagnaro, e la Prof.ssa Bovera per il loro fondamentale contributo nell’ aiutarmi materialmente e guidato costantemente.

Un ringraziamento va all’ ufficio tecnico dell’AIA, ai Prof. Fioretti, Restucci, Maiolino e Di Pineto per la loro preziosissima collaborazione alla stesura del mio lavoro di ricerca.

Inoltre, non posso fare a meno di ringraziare tutte quelle persone che hanno condiviso questi meravigliosi anni della mia vita sociale e lavorativa e che mi hanno sopportato nelle mie sfuriate e nei miei emboli e continuano a farlo: i miei cari amici, i miei parenti più stretti (soprattutto Zia Silvia ed il mio cuginetto Andrea) e la mia meravigliosa famiglia, mia madre, che nonostante le inevitabili incomprensioni, mi ha sempre sostenuto, ma in particolar modo il mio “papino eccezionale”, sostegno indispensabile, con il quale spesso mi sono scontrata ma che per me rappresenta e rappresenterà sempre un ESEMPIO RARO E COSTANTE di sacrificio e professionalità, ti voglio bene.

Ed infine, anche se è il primo fra i miei pensieri, vorrei soltanto aggiungere quanto sia stato importante, in tutto e per tutto, il mio amore, Paki, a cui dedico il RINGRAZIAMENTO più profondo in quanto mi ha supportato con pazienza e comprensione (come solo lui sa fare) dandomi costantemente fiducia, forza ed aiuto nei momenti di maggiore difficoltà.