



# UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE  
*Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria*

---

## CONTA DIFFERENZIALE DELLE CELLULE SOMATICHE: EFFETTI SUI PARAMETRI PRODUTTIVI E QUALITATIVI DEL LATTE

DIFFERENTIAL SOMATIC CELL COUNT:  
EFFECTS ON MILK QUALITY AND PRODUCTION TRAITS

Relatore: Prof. Andrea SUMMER

Correlatore: Dott.ssa Giorgia STOCCO

Laureando:  
Samuele MUTTI  
Matricola 257340

---

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

---

*Questa tesi è dedicata  
a tutta la mia famiglia.*

---

---

# Indice

RIASSUNTO .....	4
ABSTRACT .....	6
1.INTRODUZIONE .....	8
1.1 FISILOGIA DELLA LATTAZIONE .....	8
1.1.1 Cenni anatomici .....	8
1.1.2 Controllo ormonale della secrezione di latte .....	9
1.1.3 Barriera emato-mammaria .....	11
1.1.4 Meccanismi di trasporto .....	12
1.1.5 Alterazioni della permeabilità della barriera emato-mammaria .....	14
1.2 LA MASTITE NELL'ALLEVAMENTO INTENSIVO DELLA BOVINA DA LATTE .....	15
1.2.1 Classificazione delle mastiti .....	15
1.2.2 Importanza economica della mastite .....	17
1.2.3 Indicatori di mastite nel latte .....	19

---

1.3 LA RISPOSTA IMMUNITARIA ALL'INTERNO DELLA GHIANDOLA MAMMARIA .....	23
1.4 CELLULE SOMATICHE DEL LATTE: POPOLAZIONI CELLULARI INTERESSATE E RELAZIONI CON LA SALUTE DELL'ANIMALE ..	30
1.5 CONTA DIFFERENZIALE DELLE CELLULE SOMATICHE DEL LATTE E RELAZIONE CON LA SCC .....	33
1.6 QUALITÀ DEL LATTE IN RELAZIONE ALLE POPOLAZIONI LEUCOCITARIE .....	36
1.6.1 Proteine .....	36
1.6.2 Lattosio .....	38
1.6.3 Grassi .....	39
1.6.4 Urea .....	40
2. OBIETTIVI .....	41
3. MATERIALI E METODI .....	42
3.1 RACCOLTA ED ANALISI DEI CAMPIONI DI LATTE .....	42
3.2 ANALISI STATISTICA .....	44

---

---

4. RISULTATI E DISCUSSIONE .....	47
4.1 STATISTICHE DESCRITTIVE .....	47
4.2 EFFETTO DI SCS E DSCC SULLE COMPONENTI QUALITATIVE DEL LATTE .....	49
4.3 EFFETTI SIGNIFICATIVI DI SCS E DSCC SUI CARATTERI PRODUTTIVI .....	55
4.4 CONTRASTI ORTOGONALI IN FUNZIONE DELLA DSCC .....	58
5. CONCLUSIONI .....	66
6. BIBLIOGRAFIA .....	68
7. ICONOGRAFIA .....	80

# Riassunto

Il processo infiammatorio a carico della ghiandola mammaria è caratterizzato da un importante aumento delle cellule somatiche nel latte, e da una modificazione nella qualità e nella quantità del latte prodotto a seguito del passaggio di numerosi componenti dal torrente sanguigno al latte e da un decremento nell'attività secretoria. La mastite risulta essere ancora una causa di perdita economica molto importante all'interno del settore lattiero-caseario e per questo motivo, ancora oggi, si ricercano degli indicatori nel latte in grado di segnalare uno stato infiammatorio all'interno della ghiandola mammaria che siano facili e veloci da misurare.

La conta differenziale delle cellule somatiche (DSCC), data dalla proporzione di leucociti polimorfonucleati e linfociti sulla totalità delle cellule somatiche, è uno dei nuovi indicatori di infiammazione della mammella. Tuttavia, ad oggi, non ci sono studi che abbiano preso in esame le relazioni fra DSCC e composizione del latte. A tal proposito, è stata valutata la capacità discriminativa della DSCC come indicatore indiretto di modificazioni dei parametri qualitativi del latte e produttivi. È stata analizzata la composizione di 4745 campioni su un totale di 498 vacche provenienti da quattro allevamenti situati nella regione Lombardia. La produzione di latte e i caratteri produttivi (produzione di grasso, proteine, caseine e lattosio, in kg al giorno) invece sono stati analizzati su 954 campioni ottenuti da un sottoinsieme di 390 animali.

Dai risultati è emerso che il grasso diminuisce e gli acidi grassi liberi aumentano all'aumentare della DSCC, in conseguenza dell'attività lipolitica da parte dei PMN. I cambiamenti a livello di proteine, caseine, indice caseinico e contenuto di urea in relazione ai diversi livelli di DSCC riflettono la contemporanea attività di ridotta sintesi di questi componenti nel latte e aumento della perdita di proteine del siero dal sangue al latte. L'associazione positiva tra DSCC e lattosio suggerisce il ruolo nella modulazione della risposta immunitaria di questo componente del latte, mentre l'associazione positiva tra DSCC e la produzione di latte potrebbe indicare la maggiore propensione delle bovine più

---

produttive alle infezioni della mammella. Inoltre, è stato dimostrato che per gli animali vicini alla soglia, la DSCC potrebbe essere efficacemente utilizzata per identificare importanti cambiamenti nella composizione del latte in un intervallo di  $\pm 10\%$  dalla soglia.

I risultati dell'interazione tra DSCC e SCS sottolineano l'importanza di combinare le due informazioni quando la composizione del latte è presa in esame. Alla luce di questi risultati, sarebbe di grande interesse associare diversi livelli di DSCC, nonché a diverse classi di SCS, a caratteristiche di coagulazione, capacità di produzione del latte e caratteristiche di qualità del formaggio. Queste nuove informazioni sono importanti e potrebbero essere utilizzate in modo efficiente dagli allevatori per controllare la qualità del loro latte.

# Abstract

The inflammatory process of the mammary gland is characterized by an important increase of the somatic cells in milk associated with compositional changes due to the leakage of several components from the blood into the milk, and the decreased secretory activity. Mastitis is still one of the main cause of economic loss within the dairy sector. For this reason indirect indicators of udder health, easy and fast to be measured in milk, are still investigated in order to detect inflammatory state within the mammary gland.

The effect differential somatic cell count (DSCC), representing the combined proportion of polymorphonuclear leukocytes (PMN) and lymphocytes expressed in percentage, is one of these novel marker for mammary inflammatory status. However, up to date, no study has investigated the effect of DSCC on milk composition. For these reasons, the aim of this study was to evaluate the discriminatory ability of DSCC as an indirect indicator of changes in milk quality and production traits. Milk composition was analysed on 4745 samples from a total of 498 cows reared in four farms situated in the Lombardy region. Milk production and related production traits (production of fat, proteins, caseins and lactose, kg/d) were analysed on a subset of 390 animals (954 observations).

From the results, it was found that fat reduced and free fatty acids increased at growing DSCC levels, as a consequence of the lipolytic activity by PMN. Changes in milk protein, casein, casein index and urea content across DSCC levels reflected the simultaneous activities of reduced synthesis and augmented leakage of whey proteins from blood into the milk. The positive association between DSCC and lactose suggested that this milk component could have a role in the modulation of the immune response, while the positive association between DSCC and milk yield could perhaps indicate the higher propensity of high-yielding cows to udder infection. Moreover, it was evidenced that for animals close to the threshold, DSCC could be efficiently used to identify important changes in milk composition in a  $\pm 10\%$  range from the threshold.

Results from the interaction between DSCC and SCS underlined that it is important to consider their combined information when milk composition is studied. Given these results, it would be of great interest to associate different levels of DSCC, and different classes of SCS, to coagulation traits, cheese-making ability of milk, and cheese quality characteristics. These novel information are important and could be efficiently used by dairy farmers to screen the quality of their milk.

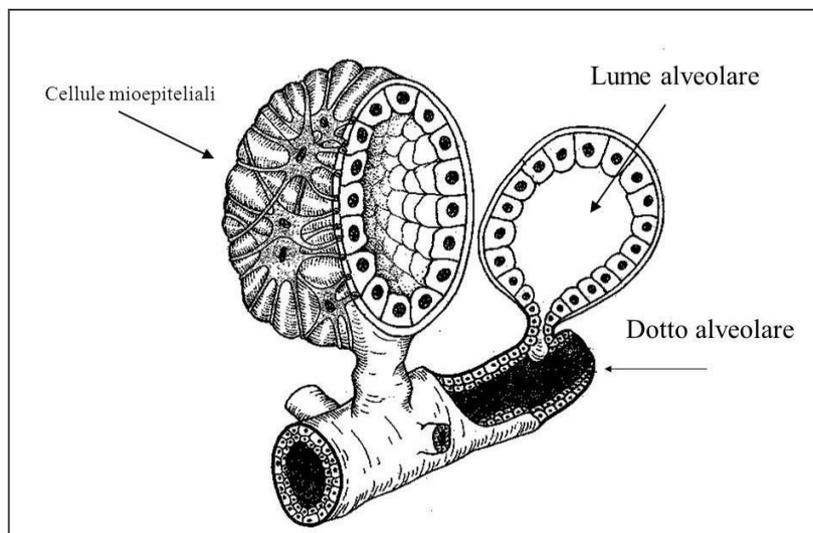
# 1.Introduzione

## 1.1 Fisiologia della lattazione

### 1.1.1 Cenni anatomici

La mammella della bovina presenta quattro quarti, ciascuno costituito da una ghiandola mammaria. L'insieme di queste quattro mammelle costituisce il complesso mammario. Tale complesso si estende, nelle buone lattifere, dall'inizio della metà caudale del tratto pubo-ombelicale fino alla parte ventrale del perineo. In ogni mammella il parenchima ghiandolare è completamente indipendente e pertanto infiammazioni ed infezioni possono colpire separatamente un solo quarto, risparmiando gli altri (Barone, 2009).

Le unità funzionali di ciascuna ghiandola mammaria sono gli alveoli (figura 1) i quali, in gruppi di 150-200 vanno a costituire i lobuli che, a loro volta, costituiscono i lobi ghiandolari (Sjaastad V. , 2013).



**Figura 1** Rappresentazione schematica dell'alveolo mammario  
Fonte: Naitana, Nuvole, & Marongiu; 1992

La ghiandola mammaria è una struttura tubulo-alveolare composta, a secrezione apocrina. Il latte viene secreto all'interno delle cellule epiteliali che rivestono il lume alveolare e,

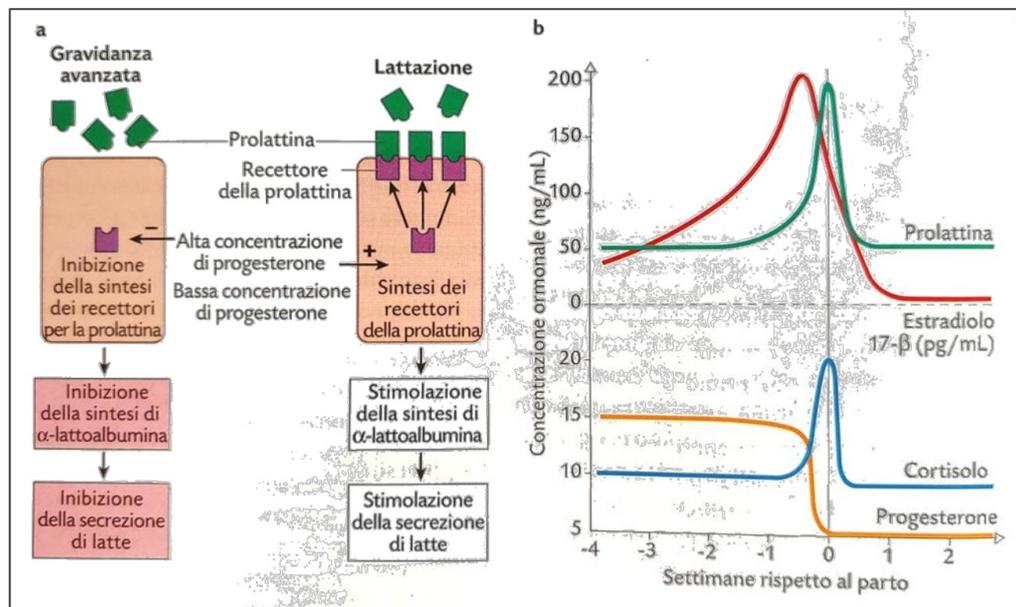
successivamente, viene convogliato nei dotti lattiferi e galattofori mediante la contrazione delle cellule mioepiteliali che formano una rete che avvolge i dotti lattiferi più piccoli. Dai dotti più piccoli, il latte passa in dotti di dimensioni sempre maggiori: dal dotto intralobulare, passando al condotto lattifero fino a giungere al seno lattifero. Quest'ultimo, posto alla base del capezzolo, afferrisce poi ad un unico dotto papillare attraverso il quale il latte viene poi escreto (Barone, 2009).

### **1.1.2 Controllo ormonale della secrezione di latte**

La sintesi e la secrezione del latte si svolgono sotto il controllo del sistema endocrino. Lo sviluppo e la funzionalità della ghiandola mammaria sono infatti strettamente correlati allo stato riproduttivo della bovina e alla richiesta di latte da parte della prole (Neville, McFadden, & Forsyt, 2002).

Si definisce lattogenesi l'inizio della secrezione latte: questo si verifica verso la fine della gravidanza, nel momento in cui le cellule epiteliali mammarie si differenziano in cellule secernenti attive (Sjaastad V. , 2013). Questo processo si divide in due fasi: lattogenesi I e lattogenesi II. Nella prima fase, che ha inizio nell'ultimo terzo di gestazione, le elevate concentrazioni di estrogeni e progesterone stimolano la crescita e la differenziazione del tessuto secretorio mentre la secrezione di prolattina da parte dell'ipofisi anteriore promuove lo sviluppo completo della mammella (Neville, McFadden, & Forsyt, 2002). Inoltre nei ruminanti, a livello placentare, viene prodotta la somatotropina mammaria (o lattogeno placentare) che si lega ai recettori della prolattina e stimola la crescita e la differenziazione delle cellule epiteliali. La regolazione del metabolismo delle cellule epiteliali mammarie è regolata dall'insulina, dall'ormone somatotropo, dagli ormoni tiroidei e dal cortisolo. In questo modo si ha una crescita netta dei lobuli con strutture alveolari completamente sviluppate associate ad una diminuzione del tessuto adiposo (Sjaastad V. , 2013). Nel periodo preparto, invece, si assiste alla lattogenesi II la quale è caratterizzata da un aumento dell'espressione di geni codificanti per le proteine del latte, dalla chiusura delle *tight junctions* (connessioni tra le cellule dell'epitelio monostratificato mammario), dallo spostamento nel lume alveolare di micelle di caseina e goccioline lipidiche citoplasmatiche e da un aumento transitorio del passaggio di immunoglobuline e altre

sostanze che caratterizzano la formazione del colostro (Neville, McFadden, & Forsyt, 2002). In questa fase gli ormoni principali sono: il cortisolo, il progesterone, la prolattina e gli estrogeni. La concentrazione elevata del progesterone inibisce sia il parto che l'inizio della lattazione, competendo con il cortisolo per i recettori intracellulari e bloccando i recettori della prolattina sulle cellule mioepiteliali mammarie. Al momento del parto, la concentrazione di progesterone cala drasticamente, favorendo l'azione del cortisolo e della prolattina, i quali agiscono in modo sinergico stimolando la lattazione. Il cortisolo stimola la crescita del reticolo endoplasmatico rugoso e dell'apparato di Golgi delle cellule epiteliali, necessari al fine di ottimizzare l'effetto della prolattina sull'avvio della produzione lattea. La prolattina infatti si lega ad alcuni recettori di membrana i quali, attivando delle tirosine chinasi intracellulari, attivano geni codificanti per le proteine nelle cellule epiteliali mammarie (figura 2[a]). Quando la concentrazione di progesterone crolla, la ghiandola mammaria è quindi in grado di rispondere alla secrezione di prolattina, significativamente aumentata da parte dell'ipofisi anteriore, aumentando la trascrizione di geni delle proteine del latte, comprese caseina e  $\alpha$ -lattoalbumina (substrato della lattosio sintetasi). In questa fase, gli estrogeni hanno la funzione di stimolare la secrezione di prolattina da parte dell'ipofisi (figura 2[b]) (Sjaastad V. , 2013).



**Figura 2** Modificazioni endocrine legate al parto e all'inizio della produzione di latte nella vacca

Fonte: Sjaastad V. , 2013

### 1.1.3 Barriera emato-mammaria

Struttura fondamentale al fine della funzionalità della ghiandola mammaria è la barriera emato-mammaria. Questa è coinvolta nella diffusione di antibiotici e sostanze nutritive dal sangue al lume ghiandolare e nel processo di diapedesi dei leucociti a seguito dell'invasione da parte di microrganismi patogeni (Guidry, O'Brien, & Douglass, 1998). Inoltre mantiene un certo gradiente osmotico tra i due compartimenti in maniera tale da permettere il passaggio di acqua nelle secrezioni mammarie (Wellnitz, Zbinden, Huang, & Bruckmaier, 2016).

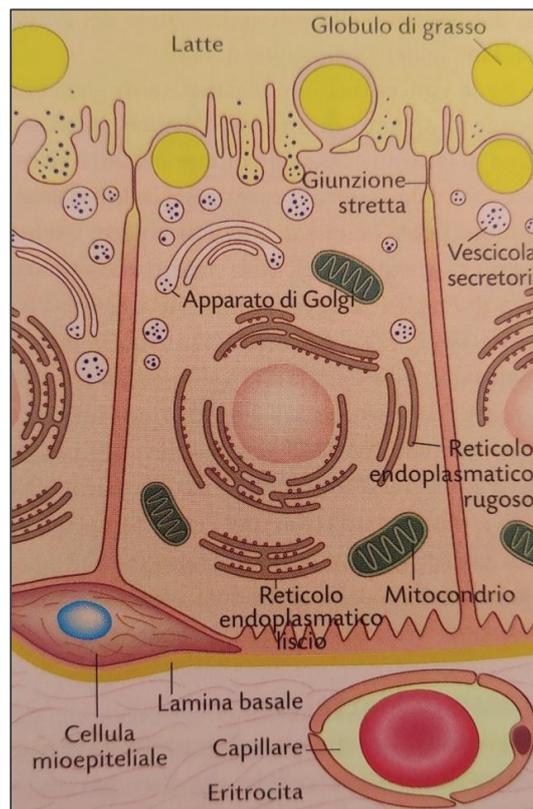
Fondamentali al fine di spiegare la sua azione di barriera fisica sono le cosiddette *tight junctions* (o *zonula occludens* o *giunzioni occludenti*). Queste, unitamente ai desmosomi (o *macula adherens*) e alle giunzioni intermedie (o *zonula adherens*), costituiscono il complesso giunzionale che regola le interazioni cellulari tra epitelio ed endotelio adiacente (Stelwagen & Singh, 2014). Oltre a costituire una barriera resistente al movimento dei soluti, tali giunzioni sono strutture dinamiche che si possono dissociare e riformare a seconda delle esigenze funzionali dei tessuti, per favorire la proliferazione delle cellule epiteliali o la migrazione dei leucociti. Esse formano una fitta rete di complessi proteici costituiti da proteine integrali di membrana (claudine, occludine e molecole di adesione giunzionale), proteine periferiche di membrana (*zonula occludens*) e molecole regolatrici quali le chinasi. Il complesso multiproteico delle *giunzioni occludenti* è legato al citoscheletro di actina attraverso delle proteine specifiche (proteine ZO). Queste proteine organizzano le componenti strutturali e modulano la via paracellulare.

Le *giunzioni occludenti* quindi non hanno la semplice funzione di regolare l'ingresso di soluti e ioni da una cellula all'altra ma, attraverso diversi mediatori cellulari e interazioni sia cellula-cellula che cellula-ECM (matrice extracellulare basolaterale), mantengono la struttura tridimensionale della cellula stessa e, di conseguenza, la sua funzionalità (Stelwagen & Singh, 2014).

### 1.1.4 Meccanismi di trasporto

A livello di barriera emato-mammaria esistono 5 vie principali attraverso cui una sostanza può essere secreta: 4 trans-cellulari (trasporto transmembrana, trasporto attraverso l'apparato di Golgi, trasporto attraverso globuli lipidici e trasporto per transcitosi) e una paracellulare (figura 3).

La via transmembrana è riservata a soluti quali acqua, urea, glucosio,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . Caseina, proteine, lattosio, citrato e calcio vengono invece trasportati o sequestrati nell'apparato di Golgi e secreti nel latte attraverso esocitosi. Altre sostanze quali lipidi, ormoni liposolubili, farmaci e alcuni fattori di crescita vengono estrusi a livello dell'apice delle cellule secretrici, avvolti da una membrana lipidica. Composti quali prolattina, transferrina e immunoglobuline invece vengono trasportati attraverso vescicole; infine, nella via paracellulare c'è passaggio diretto tra liquido interstiziale e latte (Shennan & Peaker, 2000).



**Figura 3** Diagramma riassuntivo delle principali vie di secrezione attraverso l'epitelio mammario

Fonte: Sjaastad V. , 2013

### ***1.1.4.1 Glucosio***

In una bovina in lattazione, la mammella utilizza circa il 70-80% del glucosio presente a livello di organismo, il 60-70% del quale viene utilizzato come substrato per la sintesi del lattosio (Sjaastad V. , 2013). Il lattosio è presente nel latte ad una concentrazione variabile tra il 4.8 e il 5% circa e viene sintetizzato a partire da glucosio e galattosio dalla lattosio sintetasi nell'apparato di Golgi.

A fronte di una richiesta di glucosio così elevata, diventa fondamentale l'efficienza dei meccanismi di trasporto. Il trasporto attraverso la barriera emato-mammaria avviene mediante 2 distinti processi: il primo mediato da una famiglia di carrier specifici per il glucosio (GLUT) e il secondo mediato da co-trasportatori Na<sup>+</sup>/glucosio (SGLT). Nonostante vengano espressi a diversi livelli anche GLUT3, GLUT4, GLUT5, GLUT8, GLUT12 e i co-trasportatori sodio-dipendenti SGLT1 e SGLT2, il trasportatore predominante nella bovina è GLUT1 (Zhao F. Q., 2014). L'espressione della proteina GLUT1 diminuisce con il progredire dello stadio di lattazione e diventa quasi non identificabile nella fase non-secernevole (Zhao & Lacasse, 2008).

### ***1.1.4.2 Componenti lipidiche***

I grassi sono presenti nel latte ad una concentrazione variabile tra il 3.8 e il 4% circa. Esistono due possibili meccanismi di trasporto per la secrezione di grassi. Il primo meccanismo prevede la sintesi dei trigliceridi nel reticolo endoplasmatico liscio delle cellule alveolari partendo dai precursori degli acidi grassi e dal glicerolo. Questi si fondono poi in gocce di grandi dimensioni e migrano verso la membrana apicale dove protrudono nel lume alveolare avvolte dalla membrana cellulare apicale stessa per poi abbandonare la cellula. Il secondo meccanismo prevede invece una transitosi attraverso la membrana cellulare basale e apicale per mezzo di carrier che attivamente trasferiscono i composti attraverso la membrana. I carrier implicati appartengono alla superfamiglia delle ATP-binding cassette (ABC), le quali facilitano il trasferimento dei composti attraverso la membrana cellulare tramite idrolisi di ATP (Mani, Sorensen, Sejrsen, Bruckmaier, & Albrecht, 2009).

### ***1.1.4.3 Componenti proteiche***

Le proteine sono presenti nel latte ad una concentrazione variabile tra il 3.2 e il 3.6% circa. La richiesta di aminoacidi da parte della mammella di una bovina in lattazione è pertanto imponente.

Le proteine vengono sintetizzate nel reticolo endoplasmatico rugoso delle cellule epiteliali e trasportate all'apparato di Golgi dove possono essere modificate prima di essere trasferite alle vescicole secretorie per poi essere trasportate al lume alveolare tramite esocitosi. Le immunoglobuline, indispensabili per il passaggio dell'immunità materna al vitello, sono presenti a concentrazioni elevate nel colostro, mentre si ritrovano in concentrazioni molto più ridotte nel latte. Le IgG vengono trasportate attivamente per endocitosi all'interno delle cellule epiteliali mammarie per poi essere trasferite per esocitosi nel lume alveolare. Le IgA e le IgM invece vengono prodotte da plasmacellule situate nello stroma ghiandolare (Sjaastad V. , 2013).

### **1.1.5 Alterazioni della permeabilità della barriera emato-mammaria**

La permeabilità della barriera emato-mammaria può subire grandi variazioni in funzione del periodo produttivo (lattogenesi, lattazione e fine lattazione), dell'intervento di determinati meccanismi endocrini (mediati da ormoni quali glucocorticoidi, prolattina, progesterone e serotonina) e di processi infiammatori a carico della ghiandola mammaria stessa.

In particolare, durante un processo infiammatorio, la permeabilità di tale barriera aumenta notevolmente e ciò comporta il passaggio di costituenti del sangue nel latte. Di conseguenza la composizione di tale secreto sarà considerevolmente modificata comportando danni a livello tecnologico ed organolettico (Wellnitz, Zbinden, Huang, & Bruckmaier, 2016).

## 1.2 La mastite nell'allevamento intensivo della bovina da latte

Nell'ambito dell'allevamento intensivo della bovina da latte l'unità produttiva è rappresentata dalla ghiandola mammaria, la quale è anche uno degli organi più soggetti a patologie e quindi anche a trattamenti terapeutici. Lo stato infiammatorio della ghiandola mammaria è denominato mastite.

### 1.2.1 Classificazione delle mastiti

La mastite può essere classificata in funzione dell'agente eziologico in ambientale e contagiosa. I microrganismi ambientali (*Escherichia Coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterococchi*, *Streptococcus Uberis* e *Streptococcus Dysgalactiae*, ecc.) vivono e si moltiplicano nell'ambiente di stabulazione delle bovine. La malattia può comparire in seguito ad un incremento della carica batterica ambientale o per delle deficienze nelle capacità difensive della bovina. Le mastiti contagiose, invece, sono causate da patogeni (*Staphilococcus Aureus*, *Streptococcus Agalactiae* e *Corynebacterium bovis*, ecc.) in grado di sopravvivere quasi esclusivamente a livello mammario. La via più frequente di trasmissione risulta essere quindi il latte di bovine infette.

Si comprende dunque che la patologia non è determinata solo ed unicamente dall'agente eziologico, ma anche dallo stato immunitario dell'animale e dalle condizioni ambientali. A questo proposito, l'igiene degli ambienti di stabulazione e dell'impianto di mungitura, la presenza di lesioni al capezzolo, l'età degli animali e le loro condizioni fisiche rappresentano i principali fattori di rischio a livello di allevamento (Bradley, 2002).

La mastite può manifestarsi in tre forme principali: clinica, subclinica e cronica.

Le mastiti cliniche derivano da infezioni di microrganismi che possono avvenire per via ascendente attraverso il capezzolo (colpiscono generalmente un solo quarto) o per via ematogena (possono colpire più quarti e determinare gravi ripercussioni sistemiche). In

funzione della gravità, sono classificate come lievi, moderate o gravi. La forma lieve rappresenta circa il 60-90% dei casi e prevede alterazioni unicamente a livello di secreto mammario; il quale risulta ridotto, di aspetto variabile, con possibili stralci di fibrina e materiale purulento oppure sieroso/emorragico. La forma moderata rappresenta circa il 10-30% dei casi e, oltre ad alterazioni a carico del latte, presenta anche segni di infiammazione della mammella quali aumento della temperatura, aumento del volume, consistenza anelastica, leggera dolenzia e possibile presenza di noduli di origine alveolare, con linfadenomegalia dei linfonodi sopramammari e precrurali. La forma grave costituisce circa il 5-20% delle mastiti cliniche e associa ai segni clinici precedenti sintomi generali come febbre, anoressia, blocco ruminale e calo significativo della produzione.

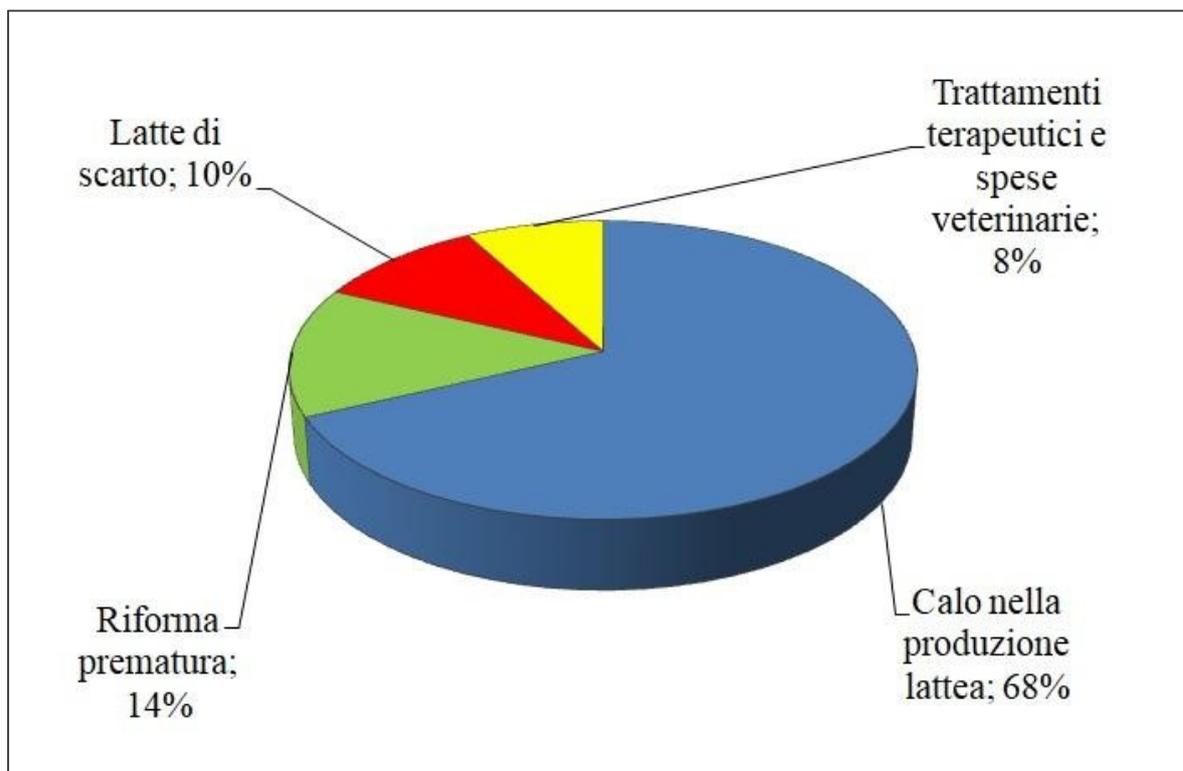
Le mastiti subcliniche sono le più subdole e difficili da diagnosticare a causa dell'assenza di manifestazioni cliniche macroscopicamente osservabili a carico del secreto, della mammella e dello stato di salute generale dell'animale. Tuttavia si può assistere ad una consistente diminuzione della produzione latte, associata ad alterazioni della sua composizione. Mediante esami di laboratorio, si possono rilevare infatti un'elevata conta delle cellule somatiche (Somatic Cell Count: SCC), un aumento della conducibilità e un incremento della carica batterica, con conseguenze negative sulle caratteristiche tecnologiche e sulle qualità organolettiche del latte.

Le mastiti croniche sono infezioni che persistono per più di 4 settimane, accompagnate da rialzo costante della SCC. Inoltre è possibile riscontrare alterazioni anatomiche (dall'atrofia all'ipertrofia con o senza indurimento fino alla presenza di noduli, i quali possono risultare in vario numero, di grandezza e consistenza variabili) e secretorie (eventuali presenze di fiocchi e coaguli e riduzioni quantitative della produzione) a carico del quarto interessato. In alcune forme si può anche giungere alla formazioni di ascessi multipli nel quarto colpito (caratteristica peculiare delle mastiti croniche da *Corynebacterium pyogenes*) (Sali, 1980). La forma cronica può saltuariamente dare origine a forme cliniche, per lo più moderate e lievi.

## 1.2.2 Importanza economica della mastite

Ancora oggi la mastite rappresenta una delle patologie più frequenti negli allevamenti di bovine da latte ed economicamente molto dannose anche nei Paesi a zootecnia avanzata. La mastite influisce anche sulla produttività e sul benessere degli animali oltre che sulla qualità del latte prodotto (Hillerton & Berry, 2005). Le perdite economiche per l'industria lattiero-casearia ammontano a circa 32 miliardi di euro annui (Seegers, Fourichon, & Beaudeau, 2003). Negli USA le perdite annuali causate dalla mastite sono stimate in 2 miliardi di dollari che rappresentano circa l'11% del valore totale del latte prodotto mentre nel Regno Unito si stima un danno economico annuo pari a circa 300 milioni di sterline (Hillerton & Berry, 2005).

La mastite comporta danni economici soprattutto per l'allevatore sia in termini di mancati introiti che di aumento dei costi di gestione della mandria (figura 4; tabella 1) (McInerney, Howe, & Schepers, 1992; Pickering, 1995).



**Figura 4** Peso percentuale costi derivanti dalla mastite  
Fonte: modificato da Pickering, 1995

L'impatto più significativo (circa il 68% sul totale del costo della mastite) è dovuto ad un calo medio nella produzione lattea stimato a circa il 10%, il quale può essere temporaneo o permanente a seconda che si tratti di una mastite acuta, subacuta o cronica (Berry, Hogeveen, & Hillerton, 2004). Anche la qualità del latte peggiora, con diminuzioni significative nel contenuto di grassi, alterazione del profilo proteico, aumento degli acidi grassi liberi, aumentata lipolisi e proteolisi (Bruckmaier, Ontsouka, & Blum, 2004; Auldust & Hubble, 1998), con conseguente peggioramento delle proprietà organolettiche e, di riflesso, con riduzione del prezzo del latte pagato alla stalla (Yalcin, 2000). Anche le proprietà di coagulazione sono profondamente alterate nel latte mastitico (Bobbo, Cipolat-Gotet, Bittante, & Cecchinato, 2016).

Di grande importanza sono poi le perdite economiche derivanti dai trattamenti terapeutici riservati ai casi di mastite clinica. A questa voce rientrano molteplici spese (circa il 18% sul totale del costo della mastite): i farmaci, i costi veterinari, le ore di lavoro aggiuntive necessarie e gli scarti di latte in seguito al trattamento antimicrobico e ai relativi tempi di sospensione (Viguiet, Arora, Gilmartin, Welbeck, & O'Kennedy, 2009). A tutto ciò vanno aggiunti i costi per le misure profilattiche che si rendono necessarie in azienda in caso di presenza di mastiti contagiose: trattamento antimicrobico in asciutta e diagnostica di laboratorio (Yalcin, 2000).

La mastite rappresenta inoltre una delle principali cause di riforma negli allevamenti di bovine da latte in seguito ad una riduzione della longevità e della produttività (circa il 14% sul totale del costo della mastite): in particolar modo è riconosciuta come responsabile di circa il 15% delle bovine riformate negli USA così come in Germania (Gruet, Maincent, Berthelot, & Kaltsatos, 2001; Schwarz, 2018). Oltretutto si osservano ridotti introiti anche in fase di riforma perché la qualità e la resa della carcassa sono basse a causa dello stato di malessere di questi animali e alla conseguente riduzione nell'ingestione che porta a cali nella copertura di grasso e nelle riserve muscolari di glicogeno dell'animale (Hillerton & Berry, 2005).

Tenendo conto di tutte queste variabili, in Olanda è stato calcolato un costo medio che varia da 164€ a 235€ per ogni vacca colpita da mastite (Huijps, Lam, & Hogeveen, 2008).

A fronte di un danno sanitario ed economico di questa entità diventa essenziale un monitoraggio continuo e una gestione attenta della mastite. Questo può essere perseguito tramite mezzi diagnostici che consentano un rilevamento dell'infiammazione ad uno stadio che sia il più precoce possibile e con costi in linea con quello che è il mercato dell'allevamento della vacca da latte.

**Tabella 1 Peso percentuale dei diversi costi causati dalla mastite stimati in diversi studi**  
Fonte: modificato da Pickering, 1995

<b>Cause di perdita economica</b>	<b>Philipot (1976)</b>	<b>Blood et al. (1983)</b>	<b>Crist et al. (1993)</b>	<b>Media aritmetica dei valori derivanti dai 3 studi</b>
Calo nella produzione latte	70%	70%	64%	68%
Riforma prematura	14%	14%	13%	14%
Latte di scarto	8%	7%	14%	10%
Trattamenti terapeutici e spese veterinarie	8%	8%	9%	8%

### 1.2.3 Indicatori di mastite nel latte

L'analisi dei campioni di latte per il sistema di pagamento di qualità del latte e per il monitoraggio della salute della mammella è progredita notevolmente a partire dagli anni '70. Attualmente la continua ricerca nel mondo scientifico e tecnologico è atta ad individuare nuovi parametri che possano fornire più informazioni utili a prendere decisioni gestionali e sanitarie mirate a un'ottimizzazione del management delle mandrie e della resa casearia e a migliorare le metodologie in uso.

Il modo migliore per identificare un'infezione mammaria nelle bovine da latte è effettuare una reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction: PCR) o un'indagine batteriologica sul latte stesso (Viguiet, Arora, Gilmartin, Welbeck, & O'Kennedy, 2009).

Tuttavia questi metodi, nonostante rappresentino il “gold standard”, non sono applicabili nella normale routine di stalla in quanto sono costosi e richiedono tempo (Nyman, Persson Waller, Bennedsgaard, Larsen, & Emanuelson, 2014).

Tra gli indicatori di mastite nel latte, il più diffuso e largamente utilizzato è la conta delle cellule somatiche (Somatic Cell Count: SCC) che aumenta in caso di episodio mastitico. Questa è stata la prima procedura utilizzata come screening nella diagnosi di mastite e ancora oggi è ritenuta tra i test più specifici ed affidabili a questo scopo. La SCC può essere determinata mediante diverse metodologie che possono essere sia dirette che indirette (tabella 2) (Kitchen, 1981). Tuttavia la SCC è influenzata da altri fattori quali lo stadio di lattazione e l'ordine di parto (Cullen, 1968). Per questo già negli anni '60 si suggeriva l'utilizzo della conta differenziale delle cellule somatiche al fine di coadiuvare la diagnosi di mastite (Cullen, 1966). Un aumento nella proporzione dei leucociti polimorfonucleati (PMN) sembra infatti essere un indicatore di infiammazione molto più specifico rispetto alla SCC (Schwarz, et al., 2011). La difficoltà tecnica nella distinzione microscopica delle cellule e il costo elevato di una diagnosi di questo tipo non hanno però permesso fino ad oggi una diffusione pratica di questa tecnica (Kitchen, 1981).

Altri indicatori di mastite nel latte, rilevabili mediante diverse metodologie (tabella 2), sono rappresentati dalle modificazioni della composizione che possono essere dovute ad un calo nella capacità di sintesi della ghiandola mammaria (lattosio) o all'aumento della permeabilità dei capillari (albumina sierica bovina, ioni ed enzimi). Il contenuto percentuale di lattosio nel latte può essere monitorato facilmente e, secondo alcuni autori, una sua riduzione permette di individuare disturbi secretori della ghiandola mammaria in maniera ancor più affidabile rispetto alla SCC (Renner, 1975). I livelli di albumina sierica bovina (Bovine serum albumin: BSA) nel latte aumentano e calano parallelamente alla SCC (Bortree, Carroll, & Schalm, 1962), tuttavia presentano tempi diagnostici inadatti ad un'applicazione di campo (Kitchen, 1981). Il contenuto di ioni (in particolare Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>) influenza soprattutto la conducibilità elettrica del latte ed è sfruttato ad oggi in gran parte come monitoraggio di mastite nei robot di mungitura, anche se non presenta una sensibilità particolarmente spiccata. La mastite infatti non è l'unico fattore in grado di influenzare la concentrazione ionica del latte: età, razza, stadio di lattazione, temperatura del latte, percentuale di grasso e frequenza di mungitura possono determinare variazioni

nella conducibilità (Viguiet, Arora, Gilmartin, Welbeck, & O'Kennedy, 2009). Gli enzimi quali ad esempio le catalasi e l'N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasi (NAGasi) sono altri possibili indicatori di mastite nel latte anche se un incremento nei loro livelli è relativamente tardivo poiché deriva dall'azione fagocitaria dei PMN (Kitchen, 1981).

C'è quindi un crescente bisogno di nuovi biomarker che siano specifici per le mastiti, facili ed economici da rilevare, individuabili già nelle primissime fasi dell'infiammazione (Viguiet, Arora, Gilmartin, Welbeck, & O'Kennedy, 2009). In quest'ottica e soprattutto con l'intenzione di ridurre l'uso dei farmaci antimicrobici è necessario porsi la criticità della diagnosi e dei trattamenti per le mastiti. Questi intesi sia come trattamento tempestivo nell'insorgenza di nuovi casi grazie ad un indicatore precoce di malattia sia come trattamento di messa in asciutta che possa essere mirato ai soli animali che ne necessitano l'impiego. Da questa finalità nasce il rinnovato interesse per la conta differenziale delle cellule somatiche (Differential Somatic Cell Count: DSCC) e soprattutto per una strumentazione che permetta di poter attingere a questi dati con tempistiche e oneri economici consoni ad una sua applicazione pratica nella gestione degli allevamenti di tutti i giorni.

**Tabella 2 Riassunto dei principali test diagnostici che sfruttano indicatori di mastite nel latte**  
 Fonte: Kitchen, 1981

Causa delle modifiche nella composizione del latte:	Test e metodologia	Fonti
<b>Risposta immunitaria dell'animale</b>	Conta delle cellule somatiche: <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Microscopia diretta</li> <li>b. Analisi automatizzata della dimensione delle particelle</li> <li>c. Colorazione fluorescente dei nuclei cellulari</li> <li>d. Test di aumentata viscosità con detergenti</li> <li>e. Determinazione chimica del DNA</li> <li>f. Determinazione dei metaboliti cellulari (ATP)</li> </ul>	Prescott & Breed (1910) Heesch (1975) Schmidt Madsen (1975) Thompson & Postle (1964) Milne & Smyth (1976) Hutjens et al. (1970) Bossuyt (1978)
<b>Riduzione nella capacità di sintesi della ghiandola mammaria</b>	Lattosio: <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Colorimetrica automatizzata</li> <li>b. Infrarosso automatizzato</li> </ul>	Fleet et al. (1972) Renner (1975)
<b>Danno tissutale e aumento della permeabilità capillare</b>	BSA: <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Immunodiffusione</li> <li>b. Immunolettroforesi</li> </ul>	Giesecke & Van Den Heever (1975) Smith et al. (1979)
	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> : <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Fotometria a fiamma (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)</li> <li>b. Chimica automatica (Cl<sup>-</sup>)</li> <li>c. Elettrodi specifici per gli ioni</li> <li>d. Misurazione della conducibilità elettrica</li> </ul>	Fleet et al. (1972) Fleet et al. (1972) Ryan (1975) Linzell et al. (1974) Gebre-Egziabher et al. (1979)
	Enzimi: <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Catalasi</li> <li>b. N-acetil-β-D-glucosaminidasi</li> </ul>	Spencer & Simon (1960) Kitchen et al. (1978)

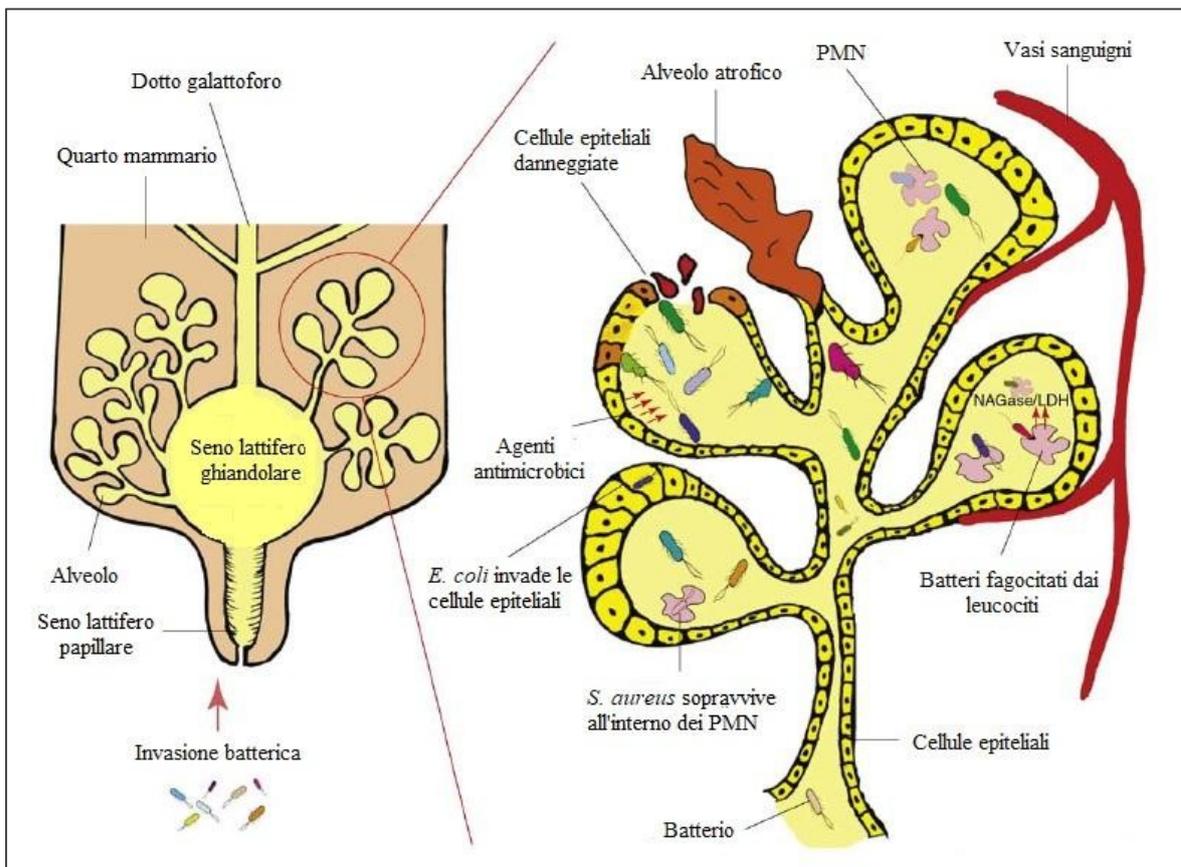
## **1.3 La risposta immunitaria all'interno della ghiandola mammaria**

Nella maggior parte dei casi l'agente eziologico della mastite è un microrganismo patogeno che riesce ad invadere la ghiandola mammaria attraverso il dotto papillare. Per questa ragione la parte terminale del capezzolo è considerata la prima linea di difesa della mammella nei confronti degli agenti patogeni (Sordillo, Shafer-Weaver, & DeRosa, 1997). Il capezzolo rappresenta infatti una barriera meccanica formidabile grazie alla presenza di cheratina (Capuco, Bright, Pankey, Wood, Miller, & Bitman, 1992; Hibbitt, Cole, & Reiter, 1969; Treece, Morse, & Levy, 1966) e di muscoli sfinteri che mantengono chiuso l'ostio papillare nel lasso di tempo che intercorre tra due diverse mungiture (Murphy & Stuart, 1953).

I microrganismi patogeni che riescono a superare la barriera fisica rappresentata dalle difese anatomiche della ghiandola mammaria, devono poi eludere le difese immunitarie della stessa per instaurare la patologia (Sordillo, Shafer-Weaver, & DeRosa, 1997). I leucociti sono i principali attori dell'immunità e intervengono nelle attività di difesa dell'organismo verso agenti patogeni quali possono essere batteri, virus, parassiti, microalghe ecc.

Nella risposta immunitaria della mammella sono coinvolti il sistema immunitario innato e l'adattativo. La loro azione sinergica fornisce alla ghiandola mammaria una protezione ottimale nei confronti di eventuali infezioni (Sordillo, Shafer-Weaver, & DeRosa, 1997). Il sistema immunitario innato è il più importante meccanismo di difesa: interviene immediatamente dopo aver individuato una minaccia e comprende principalmente macrofagi, neutrofilo e natural killer (NK). Oltre alla componente cellulare, il sistema immunitario della mammella presenta anche componenti solubili che non sono dirette specificatamente contro i microrganismi invasori. Questi composti possono essere sintetizzati direttamente dalla ghiandola mammaria (lattoferrina e lisozima), oppure possono essere trasferiti nel latte dal sangue (immunoglobuline e complemento) (Bruckmaier & Wellnitz, 2017). Tale risposta non è influenzata dal numero di esposizioni

allo stesso agente patogeno (Sordillo, Shafer-Weaver, & DeRosa, 1997). I componenti del sistema immunitario adattativo invece riconoscono specifici determinanti antigenici di specifici agenti patogeni e sono rappresentati dai linfociti e dalle immunoglobuline coadiuvati dai macrofagi (Bruckmaier & Wellnitz, 2017). La risposta adattativa, a differenza di quella innata, è più efficiente dopo esposizioni ripetute allo stesso agente patogeno grazie alla memoria linfocitaria (Sordillo, Shafer-Weaver, & DeRosa, 1997).



**Figura 5** Rappresentazione schematica dello sviluppo di una mastite in una mammella infetta. I microrganismi ambientali e contagiosi invadono la mammella per via canalicolare ascendente e si moltiplicano danneggiando gli epitelociti che rivestono gli alveoli. Questi vengono attaccati dai PMN, la cui azione comporta ulteriori danni tissutali.

Fonte: modificato da Viguiet, Arora, Gilmartin, Welbeck, & O'Kennedy, 2009

I PMN e i macrofagi rappresentano la prima linea di difesa cellulare della ghiandola mammaria. In una mammella sana i macrofagi sono la popolazione cellulare predominante (Jensen & Eberhart, 1981). Questi ultimi, unitamente ad alcune cellule epiteliali

mammarie, rivestono il ruolo di sentinella nei confronti di microrganismi patogeni agenti eziologici di mastite (Paape, Mehrzad, Zhao, Detilleux, & Burvenich, Aprile 2002). Le sentinelle riconoscono i Pattern molecolari associati al patogeno (Pathogen Associated Molecular Pattern: PAMP) mediante i recettori Toll-like (Toll-Like Receptor: TLR) quindi rilasciano citochine ad azione chemiotattica e proinfiammatoria (IL-1, IL-2, IL-8 e TNF $\alpha$ ).

L'essudazione infiammatoria dei PMN si divide in quattro fasi: marginazione, adesione, diapedesi e migrazione. Nella marginazione si osserva uno spostamento dei leucociti verso la periferia del lume vascolare dovuto al rallentamento del flusso ematico legato alla vasodilatazione e alla modificata permeabilità vasale. A contatto con la superficie delle cellule endoteliali, avviene l'adesione per mezzo di specifiche molecole. Le molecole presenti sulle membrane dei PMN (L-selectine, integrine  $\beta$ 2 e CD11) legano le molecole di adesione che si trovano sulle cellule endoteliali (ICAM-1, ICAM-2 e ELAM-1) e permettono poi la diapedesi e la migrazione per chemiotassi verso il punto di infezione (McGavin & Zachary, 2008). Vengono così reclutati dal circolo sanguigno i PMN, la cui attività fagocitaria rappresenta il più efficace metodo di difesa nei confronti di infezioni batteriche. I PMN rappresentano infatti il tipo cellulare predominante durante le prime fasi dell'infiammazione costituendo anche il 90% del totale dei leucociti presenti nella ghiandola mammaria (Sordillo, Nickerson, Akers, & Oliver, 1987) Questa risposta infiammatoria è molto rapida ma non è specifica. Se i leucociti vengono reclutati rapidamente dal circolo sanguigno possono arrestare immediatamente lo stimolo infiammatorio eliminandone la causa (i microrganismi mastitogeni) e, in questo caso, il reclutamento di cellule infiammatorie cessa. Tuttavia se i microrganismi mastitogeni riescono a sopravvivere, il processo infiammatorio continua esitando in una migrazione massiccia di leucociti, in particolar modo di PMN (Capuco, Paape, & Nickerson, 1986).

Quando il PMN aderisce al batterio rilascia potenti ossidanti responsabili del fenomeno di stress ossidativo (o respiratory burst) in maniera tale da ucciderlo e fagocitarlo (Burvenich, Guidry, Capuco, & Paape, 1996). Tuttavia questi potenti ossidanti risultano essere un'arma a doppio taglio perché non distruggono solo i batteri ma anche i tessuti circostanti l'area, risultando dannosi per le cellule secretorie mammarie e riducendo di conseguenza la produzione delle bovine. Il danneggiamento tissutale è limitato dall'induzione dell'apoptosi dei PMN. Attraverso questo processo le sostanze chimiche dannose vengono

---

murate all'interno dei PMN morenti che vengono poi ingeriti dai macrofagi per minimizzare ulteriori danni ai tessuti (Paape, Mehrzad, Zhao, Detilleux, & Burvenich, Aprile 2002).

È stato però osservato che anche l'azione meccanica del gruppo di mungitura causa una migrazione di PMN: immediatamente dopo la mungitura la concentrazione di PMN nel sangue cala, a discapito di un suo aumento nel latte (Paape & Guidry, 1969). Inoltre la sintesi di nuovo latte porta alla migrazione di nuovi PMN dagli alveoli ai dotti della ghiandola mammaria. I PMN presenti in mammella da più tempo presentano una riduzione della loro capacità fagocitaria e una forma più tonda perché hanno fagocitato globuli di grasso e caseina (Paape & Guidry, 1977). Nelle bovine da latte è stato osservato che la concentrazione di PMN circolanti durante l'inizio della lattazione ha un'ereditabilità alta ( $h^2=0.87$ ) e questo aspetto potrebbe essere sfruttato nello studio di nuovi programmi di selezione genetica (Detilleux, Koehler, Freeman, Kehrl, & Kelley, 1994).

I macrofagi rivestono un ruolo importante anche nell'immunità specifica: la loro capacità fagocitaria può essere notevolmente incrementata dalla presenza di anticorpi opsonizzanti per specifici patogeni. Tuttavia, così come accade per i PMN, questa capacità fagocitaria viene meno con il tempo a causa dell'ingestione indiscriminata di globuli di grasso, caseina e altri componenti del latte (Paape, Wergin, & Guidry, 1981). Nell'ambito dell'immunità specifica i macrofagi rivestono un ruolo fondamentale nella processazione e nella presentazione dell'antigene (Fitzpatrick, Cripps, Hill, Bland, & Stokes, 1992). Gli antigeni dei batteri ingeriti e processati dai macrofagi appaiono sulla membrana dei macrofagi stessi in associazione al complesso maggiore di istocompatibilità di tipo II (Major Histocompatibility Complex II: MHC II). Questo MHC II è necessario affinché i linfociti riconoscano gli antigeni dei microrganismi invasori.

I linfociti sono le sole cellule del sistema immunitario che riconoscono gli antigeni attraverso recettori di membrana che sono specifici per il patogeno (Sordillo, Shafer-Weaver, & DeRosa, 1997). I linfociti T-helper producono citochine in risposta al riconoscimento di un complesso antigene-MHC presentato da una cellula presentante l'antigene (Antigen Presenting Cell: APC) (Linfocita B, macrofago o cellula dendritica) e grazie a queste citochine attivano linfociti B, linfociti T, macrofagi e varie altre cellule che intervengono nella risposta immunitaria adattativa.

Tra i linfociti, i CD8<sup>+</sup> sono i più rappresentati sia nei tessuti sia nelle secrezioni delle ghiandole mammarie sane: a differenza del sangue, dove il rapporto CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> è >1, nella mammella questo rapporto è <1 (Mehrzaad & Zhao, 2008). La ragione di questa predominanza di linfociti citotossici è da ricercare nella loro capacità di riconoscere ed eliminare cellule self alterate tramite la presentazione dell'antigene in associazione al complesso maggiore di istocompatibilità di tipo I (Major Histocompatibility Complex I: MHC I). In questo modo i linfociti T citotossici rimuovono le vecchie cellule secretorie danneggiate, la cui presenza potrebbe aumentare la suscettibilità della ghiandola mammaria alle infezioni (Taylor, Dellinger, Cullor, & Scott, 1994).

I fattori solubili della difesa intervengono unitamente alla difesa cellulare a salvaguardia del parenchima mammario. Le immunoglobuline rappresentano la componente umorale della difesa specifica. Sono proteine prodotte dalle plasmacellule ovvero da linfociti B che, attivati dal contatto con l'antigene, proliferano e si differenziano. Nelle difese della ghiandola mammaria si riconoscono fondamentalmente quattro classi di immunoglobuline (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgA e IgM) la cui concentrazione varia in funzione dello stadio di lattazione e dello stato di infezione (Musoke, Rurangirwa, & Nantulya, 1987). Nelle ghiandole mammarie sane la concentrazione di immunoglobuline è bassa durante la lattazione ma cresce lentamente durante il periodo di asciutta sino a raggiungere il picco nella colostrogenesesi (Sordillo, Nickerson, Akers, & Oliver, 1987). Elevate concentrazioni di immunoglobuline sono presenti anche durante l'infiammazione. La concentrazione di Ig dipende infatti dal grado di permeabilità del tessuto secernente e dalla quantità di cellule Ig-secernenti presente. Le IgG sono le immunoglobuline predominanti nella secrezione latte di una ghiandola mammaria sana. I neutrofilo trasportano IgG<sub>2</sub> quando migrano nel sito di infiammazione (Musoke, Rurangirwa, & Nantulya, 1987). Le IgG<sub>1</sub>, le IgG<sub>2</sub> e le IgM possono fungere da opsonine batteriche, favorendo la fagocitosi dei neutrofilo e dei macrofagi. Gli anticorpi possono legare i batteri patogeni direttamente o per mezzo del fattore C3b del complemento (Howard, Taylor, & Brownlie, 1980). Le IgA non intervengono nell'opsonizzazione dei batteri, tuttavia contribuiscono a prevenire la colonizzazione batterica e a neutralizzare le tossine (Musoke, Rurangirwa, & Nantulya, 1987).

Le citochine invece sono un gruppo eterogeneo di proteine. I principali gruppi di citochine sono: le interleuchine (IL), i colony-stimulating factor (CSF), gli interferoni (IFN) e i tumor necrosis factor (TNF).

Tra le interleuchine la più studiata a livello di ghiandola mammaria è l'IL-2. Prodotta dai linfociti T helper, è responsabile dell'espansione clonale e della costituzione della memoria immunitaria conseguente alla stimolazione mitogenica ed antigenica. Ricopre un ruolo chiave nella crescita e nella differenziazione dei linfociti B, nella stimolazione delle cellule del timo e nell'attivazione delle cellule natural killer (NK) (Magnuson, et al., 1987; Sordillo, Redmond, Campos, Warren, & Babiuk, 1991).

I CSF sono un gruppo di citochine necessarie per la proliferazione e la differenziazione di numerose cellule staminali ematopoietiche. Ogni CSF è specifica per una particolare linea cellulare. I Granulocyte-CSF (G-CSF) sono necessari per la crescita, la sopravvivenza e la differenziazione dei granulociti. I Granulocyte-Macrophage-CSF (GM-CSF) inducono la differenziazione in granulociti e macrofagi ma intervengono anche nella modulazione di diverse funzioni dei granulociti maturi (Sordillo, Shafer-Weaver, & DeRosa, 1997).

Gli IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  sono prodotti da molteplici tipi di cellule immunitarie in risposta a diversi stimoli quali infezioni virali, metaboliti batterici e cellule tumorali. L'INF- $\gamma$  implementa l'attività delle cellule NK e dei linfociti T citotossici (Sordillo, Shafer-Weaver, & DeRosa, 1997).

Il TNF- $\alpha$  è una citochina di fase acuta ed è il maggiore mediatore dello shock endotossico durante la mastite iperacuta da coliformi. La reazione infiammatoria illimitata causata dal rilascio di lipopolisaccaridi (LPS) è mantenuta appunto da questa citochina (Lohuis, Verheijden, Burvenich, & Van Miert, 1988).

La ghiandola mammaria si avvale anche di componenti batteriostatiche non specifiche che fanno parte dell'immunità innata. Tra queste componenti le principali sono: la lattoferrina, il complemento, il lisozima e il sistema lattoperossidasi (LP-s).

La lattoferrina è una proteina chelante del ferro prodotta dalle cellule epiteliali e dai leucociti. In presenza di bicarbonato, sequestra gli ioni ferrici presenti nel latte prevenendo la crescita batterica (Bullen, Rogers, & Griffiths, 1978). Nella ghiandola mammaria sana la

concentrazione della lattoferrina è bassa, ma subisce un incremento durante l'involutione e l'infiammazione della ghiandola stessa (Sordillo, Nickerson, Akers, & Oliver, 1987) (Smith & Oliver, 1981).

Il complemento è un insieme di proteine presenti nel latte e nel siero. Queste funzionano in concerto con gli anticorpi per lisare i batteri invasori anche se rivestono un ruolo battericida minoritario nelle difese della ghiandola mammaria (Reiter & Oram). Come la lattoferrina, la concentrazione maggiore di complemento si ha nel colostro, nelle ghiandole mammarie infiammate e in involuzione.

Il lisozima è una proteina battericida presente nel latte la quale rompe il peptidoglicano della parete cellulare dei batteri Gram-positivi così come la membrana esterna dei batteri Gram-negativi (Reiter & Oram). Il lisozima sembra però non essere molto efficace nella protezione della ghiandola mammaria bovina (Chandran, Shahani, & Holly, 1964).

La lattoperossidasi ha un'azione batteriostatica verso i batteri Gram-positivi e battericida nei confronti dei batteri Gram-negativi (Outteridge & Lee, 1988). Tali funzioni sono esplicate mediante la produzione di ipotiocianato, un metabolita reattivo dell'ossidazione del tiocianato (Reiter & Oram).

## **1.4 Cellule somatiche del latte: popolazioni cellulari interessate e relazioni con la salute dell'animale**

Il termine «cellule somatiche» venne elaborato da Prescott e Breed nel 1910, perché si pensava che il rialzo di cellule osservato nel latte di un animale con mastite fosse causato da un superiore sfaldamento delle cellule epiteliali distaccatesi dagli alveoli mammari. Oggi sappiamo che il loro numero e la loro importanza all'interno della conta totale delle cellule somatiche del latte è marginale (Zecconi A. , 2007), tuttavia le cellule somatiche conservano inalterata questa denominazione per indicare le componenti cellulari del latte che subiscono un notevole aumento in caso di mastite (Zecconi A. , 2007). La SCC è il numero di cellule per millilitro di latte. In una ghiandola mammaria sana in fase di lattazione la SCC risulta essere  $<10^5$ /ml di latte. Nel corso di un'infezione intramammaria, la SCC può subire un notevole incremento raggiungendo anche  $10^6$ /ml di latte nel corso di poche ore (Persson, Sandgren, & Rodriguez-Martinez, 1992).

Le cellule somatiche comprendono in proporzioni variabili: i macrofagi, i linfociti, i PMN e, solo in minima parte, le cellule epiteliali (Paape, Mehrzad, Zhao, Detilleux, & Burvenich, Aprile 2002). La proporzione delle cellule è variabile e ci sono diversi risultati contraddittori sulla composizione della SCC di una ghiandola mammaria sana (tabella 3).

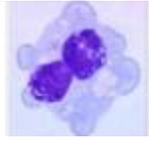
La SCC nel latte è influenzata da diversi fattori come il livello produttivo dell'animale, lo stadio di lattazione e fattori ambientali e gestionali (Rupp, Boichard, Bertrand, & Bazin, 2000). Tuttavia la SCC è utilizzata come indicatore della sanità della mammella e della qualità del latte. Bobbo et al. hanno riscontrato una relazione lineare tra le proteine sieriche e il SCS. Tale relazione, positiva per le globuline, risulta essere negativa per la concentrazione di albumine nel sangue (Bobbo, et al., 2017). In caso di infezione infatti la sintesi epatica di albumine cala per favorire la produzione di globuline (Bertoni, Trevisi, Han, & Bionaz, 2008). Inoltre la concentrazione di albumine nel sangue cala anche in seguito ad una maggiore permeabilità a livello di barriera emato-mammaria (Kitchen,

1981). Di conseguenza, per quanto riguarda le bovine da latte, un elevato SCS corrisponde ad un basso rapporto albumine/globuline e indica uno stato infiammatorio (Bobbo, et al., 2017).

Quando la SCC  $>2 \times 10^6$  cellule/ml la ghiandola mammaria è considerata infetta e quindi mastitica (Li, Richoux, Boutinaud, Martin, & Gagnaire, 2014) mentre quando la SCC  $>4 \times 10^5$  cellule/ml il latte è considerato non idoneo al consumo umano nell'Unione Europea (Regolamento (CE) 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, 2004; Regolamento (CE) 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, 2004). Questo poiché le cellule somatiche sono coinvolte nella protezione della ghiandola mammaria dalle infezioni. Si osserva una concomitanza tra la presenza di una elevata SCC e modificazioni fisico-chimiche del latte, conta batterica e stato infiammatorio della ghiandola mammaria (Li, Richoux, Boutinaud, Martin, & Gagnaire, 2014). L'effetto della SCC in termini di modificazioni composizionali e alterazioni fisico-chimiche nel latte si esplica mediante due aspetti: l'azione diretta delle cellule somatiche e dei loro enzimi endogeni e l'azione di un elevato livello di microrganismi invasori che risulta essere presente in concomitanza con un'elevata SCC (Li, Richoux, Boutinaud, Martin, & Gagnaire, 2014).

**Tabella 3 Caratteristiche e composizione delle cellule somatiche di una ghiandola mammaria sana**

Fonte: (Li, Richoux, Boutinaud, Martin, &amp; Gagnaire, 2014)

	<b>Macrofagi</b>	<b>PMN</b>	<b>Linfociti</b>	<b>Cellule epiteliali</b>	<b>Fonti</b>
<b>Cellule bovine colorate con blu di metilene</b>					ISO 13366-1/IDF148-1
<b>Caratteristiche morfologiche</b>	Nucleo grande	Nucleo polilobato	Nucleo denso e tondeggiate	Nucleo tondeggiate	ISO 13366-1/IDF148-1
<b>Funzioni biologiche</b>	-Fagocitosi -Uccisione intracellulare dei batteri -Presentazione dell'antigene -Secrezione di chemochine	-Fagocitosi -Uccisione intracellulare dei batteri -Secrezione di fattori antibatterici -Rilevazione di chemochine	-Sistema immunitario specifico -Produzione di citochine regolatorie -Lisi di cellule self alterate o danneggiate	Secrezione di chemochine	Burvenich et al. 2003; Lee et al. 1980; Paape et al. 1979; Paape et al. 2002; Paape et al. 2003; Sordillo et al. 1997; Sordillo & Streicher 2002
<b>Percentuale di ogni tipo cellulare secondo diversi studi</b>	35-79	3-26	16-28	2-15	ISO 13366-1/IDF148-1
	26	16	23	36	Benic et al. 2012
	40	10	50	-	Riva set al. 2006
	60	12	28	-	Marino et al. 2005
	13	28	29	45	Leitner et al. 2000

## 1.5 Conta differenziale delle cellule somatiche del latte e relazione con la SCC

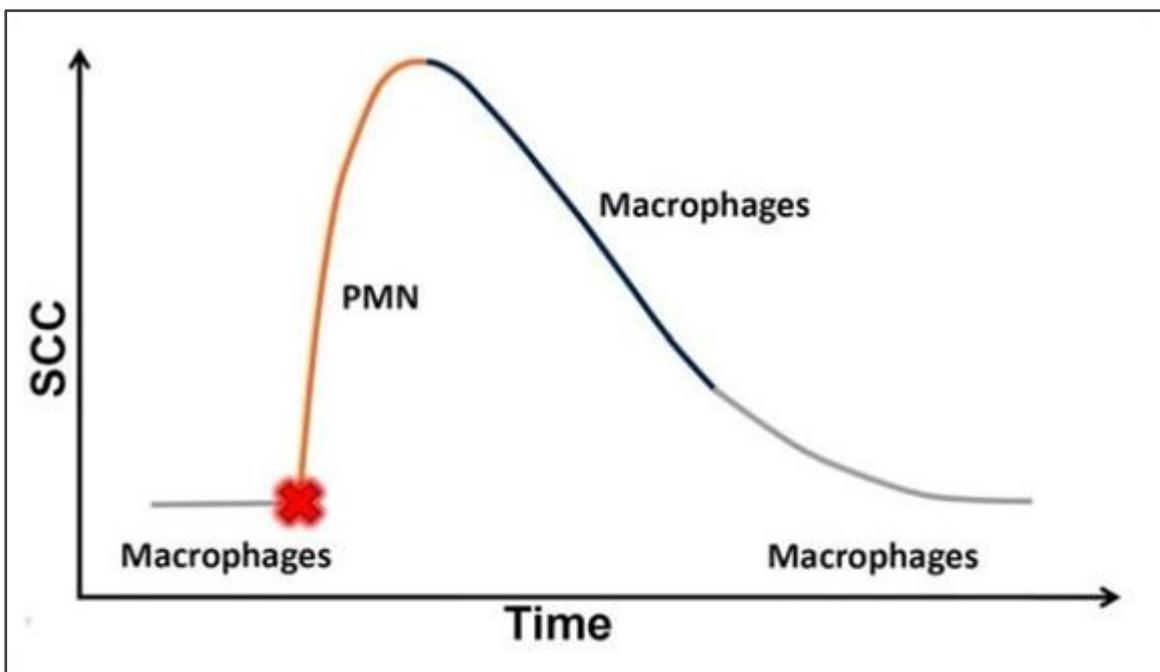
La SCC è un parametro quantitativo ben consolidato nella diagnosi di mastite ma non fornisce alcuna informazione in termini di proporzioni delle diverse cellule infiammatorie che la compongono (Schwarz, 2018; Li, Richoux, Boutinaud, Martin, & Gagnaire, 2014). Con questa finalità è stato introdotto un nuovo parametro: la conta differenziale delle cellule somatiche del latte (Differential Somatic Cell Count: DSCC). La DSCC consiste nella proporzione indiscriminata di PMN e linfociti sulla totalità della SCC (in %). La percentuale di macrofagi si ricava per differenza (100-DSCC), considerando trascurabile la percentuale di cellule epiteliali di sfaldamento (Schwarz, 2018).

La SCC è di norma bassa ( $<10^5$  cellule/ml di latte) in una ghiandola mammaria sana e il tipo cellulare predominante è rappresentato dai macrofagi i quali fungono da sentinella. Quando vi è un'infezione batterica, i macrofagi rilevano la presenza del microrganismo e iniziano la risposta immunitaria reclutando un numero elevato di PMN nel sito di infezione. Di conseguenza la SCC aumenta in maniera significativa ( $>10^6$  cellule/ml di latte) e la popolazione cellulare è composta prevalentemente da PMN, la cui funzione principale è quella di fagocitare i microrganismi. Quando i microrganismi sono stati eliminati, la SCC inizia a diminuire e la popolazione cellulare predominante torna ad essere quella dei macrofagi. In questa fase però la funzione macrofagica principale è riparare i tessuti e rimuovere i detriti cellulari (figura 6). Quando poi la SCC torna ad essere  $<10^5$  cellule/ml di latte, i macrofagi tornano alla loro funzione di sentinella. In queste variazioni i linfociti sembrano rivestire un ruolo minoritario da un punto di vista numerico nonostante la loro funzione di regolazione dell'induzione e della soppressione della risposta immunitaria (Schwarz, 2018).

Riassumendo, la DSCC risulta bassa in ghiandole mammarie sane dove la popolazione cellulare è composta prevalentemente da macrofagi, mentre si alza in maniera evidente in caso di latte mastitico. I valori di DSCC si innalzano anche in casi in cui il valore di SCC cresce solo moderatamente. SCC elevate ( $>200\ 000$  cellule/ml) associate a DSCC elevate

(>86%) possono essere utilizzate come indicatori di stadio iniziale di mastite mentre alte SCC in combinazione con bassi livelli di DSCC (<86%) potrebbero indicare uno stadio tardivo di mastite. Anche se le SCC risultano basse, elevati livelli di DSCC possono far sospettare un'infezione in atto (Schwarz, 2018).

Tuttavia campioni di latte prelevati da vacche sane che presentano una SCC <50 000 cellule/ml non danno risultati attendibili in termini di DSCC in quanto il numero di SCC è troppo basso per poter determinare correttamente la DSCC (Schwarz, 2018).



**Figura 6** Diagramma schematico dell'evoluzione della SCC e della composizione cellulare del latte in corso di mastite

Fonte: Schwarz, 2018

La DSCC fornisce un'informazione più precisa riguardo il reale stato sanitario della ghiandola mammaria delle bovine. Rappresenta quindi un prezioso strumento che consente di migliorare lo screening per le mastiti nel quadro dei test di gestione della mandria da latte. Tutto ciò risulta essere un valido aiuto nella riduzione della prevalenza delle mastiti e, di conseguenza, nella riduzione della somministrazione di antimicrobici (Schwarz, 2018). Eventuali applicazioni della DSCC in fase di studio sono: la messa in asciutta

selettiva, una migliore analisi della salute della mammella in vacche fresche e la selezione dei campioni di latte da sottoporre a test batteriologico (ad esempio PCR) (Schwarz, 2018).

La DSCC è un tratto ereditabile e la sua ereditabilità ( $0.08 \pm 0.02$ ) è più alta rispetto a quella della SCC ( $0.04 \pm 0.02$ ). L'ereditabilità della DSCC varia però con l'età risultando più bassa nelle primipare ( $0.04 \pm 0.04$ ) rispetto alle secondipare ( $0.14 \pm 0.08$ ) o ad animali con 3 o più parti ( $0.10 \pm 0.06$ ) (Bobbo, Penasa, & Cassandro, 2019). Ciononostante l'ereditabilità della DSCC è molto bassa rispetto ad altri tratti qualitativi del latte. Esiste però una debole correlazione tra la DSCC e alcuni parametri qualitativi del latte: tale correlazione risulta essere positiva per quanto riguarda la percentuale di lattosio e l'urea nel latte ( $0.16 \pm 0.15$ ) mentre è negativa per quanto riguarda il pH ( $-0.14 \pm 0.14$ ) (Bobbo, Penasa, & Cassandro, 2019). Questo aspetto ci suggerisce il potenziale uso della DSCC anche in programmi di selezione genetica mirati ad aumentare la resistenza dei capi nei confronti delle mastiti.

## 1.6 Qualità del latte in relazione alle popolazioni leucocitarie

Generalmente una SCC elevata nel latte è associata ad un'alterazione nella qualità delle proteine, ad una modificazione della composizione degli acidi grassi, ad una riduzione del contenuto di lattosio, di ioni e minerali, ad un'incrementata attività enzimatica e ad un pH più elevato nel latte crudo (Ogola, Shitandi, & Nanua, 2007).

I meccanismi fisiologici associati alla mastite e all'aumento della SCC alla base delle modificazioni nella composizione del latte sono fondamentalmente due: un aumento della permeabilità della barriera emato-mammaria che aumenta la concentrazione nel latte di componenti derivanti dalla circolazione sanguigna (proteine sieriche e ioni) (Schalm, Carroll, & Jain, 1971) e il danneggiamento delle cellule ghiandolari secretorie che riducono la sintesi di quelle componenti del latte sintetizzate all'interno della ghiandola mammaria stessa (lattosio, grasso e caseine) (Schultz, 1977). Si osserva inoltre un incremento nell'attività proteolitica e lipolitica (Auldist & Hubble, 1998).

### 1.6.1 Proteine

Il contenuto totale di proteine del latte può non subire variazioni significative all'aumentare della SCC (Haenlein, Schultz, & Zikakis, 1973). Il quadro risulta più chiaro qualora si analizzi separatamente ciascuna proteina. Le proteine sintetizzate in gran parte all'interno della ghiandola mammaria ( $\alpha$ -caseina,  $\beta$ -caseina,  $\alpha$ -lattoalbumina e  $\beta$ -lattoalbumina) decrescono mentre le altre proteine, che provengono dal circolo sanguigno (albumine sieriche e immunoglobuline), aumentano all'aumentare della SCC (Haenlein, Schultz, & Zikakis, 1973; Wickstrom, Perrson-Waller, Lindmark-Mansson, Ostensson, & Sternesjo, 2009). Tuttavia la correlazione della SCC con  $\alpha_{s1}$ -caseina e  $\beta$ -caseina è controversa poiché se per alcuni autori tale correlazione è negativa (Haenlein, Schultz, & Zikakis, 1973; Kiddy, Groves, McCann, & Treece, 1968), per altri non risulta essere

significativa attribuendo la variazione dell'indice caseinico, osservata in presenza di un'elevata SCC, al solo incremento delle siero proteine (Ng-Kwai-Hang, Hayes, Moxley, & Monardes, 1984). Nel complesso si osserva però un bilanciamento tra le variazioni dei diversi contenuti proteici i quali risultano in una concentrazione di proteine totali fondamentalmente invariata (Schultz, 1977). Tuttavia la percentuale di azoto non caseinico (NCN) aumenta notevolmente all'aumentare dei livelli di SCC mentre l'indice caseinico si riduce (Le Roux, Colin, & Laurent, 1995; Coulon, Gasqui, Barnouin, Ollier, Pradel, & Pomiès, 2002; Ogola, Shitandi, & Nanua, 2007).

Anderson ed Andrews studiando le modificazioni nelle concentrazioni proteiche nel latte individuale dopo infusione nelle mammelle di *Streptococcus agalactiae* o endotossine batteriche, scoprirono che le variazioni di  $\alpha$ -lattoalbumina e  $\beta$ -lattoalbumina erano limitate, mentre la concentrazione di albumine sieriche e IgG aumentavano in maniera evidente (Anderson & Andrews, 1977). Notarono che le IgG<sub>1</sub> e le IgG<sub>2</sub> venivano trasferite passivamente subito dopo le infusioni dei patogeni mentre le IgA e le IgM erano controllate mediante altri meccanismi. Sia la concentrazione di  $\alpha_{s1}$ -caseina sia quella di  $\beta$ -caseina diminuivano subito dopo le infusioni, ma la  $\beta$ -caseina in maniera molto più importante e netta. Analoghe modificazioni sono state osservate per la  $\kappa$ -caseina, mentre la para- $\kappa$ -caseina presenta un incremento notevole a seguito di un aumento della SCC. Questa particolare osservazione supporta la teoria secondo cui le proteinasi che originano dai leucociti sono responsabili sia della produzione di para- $\kappa$ -caseina che della marcata riduzione della  $\alpha_{s1}$ -caseina e della  $\beta$ -caseina (Anderson & Andrews, 1977).

Le due maggiori proteasi proprie del latte sono la plasmina e il suo zimogeno (il plasminogeno). Entrambe passano nel latte dove il plasminogeno è attivato a plasmina e catalizza l'idrolisi della  $\beta$ -caseina (Bastian & Brown, 1996). Oltre a permettere il passaggio di diverse componenti sieriche tra cui l'albumina sierica e le immunoglobuline, l'aumentata permeabilità della barriera emato-mammaria permette il passaggio di numerosi leucociti. I PMN contengono l'urochinasi e gli attivatori di plasmina tissutale che incrementano l'attività proteolitica (Ballou, Pasquini, Bremel, Everson, & Sommer, 1995). I PMN hanno quindi un ruolo indiretto di implementazione della proteolisi oltre a contenere anche altre proteinasi intracellulari, tra le quali l'elastasi, le catepsine (B, D, e G) e le metalloproteinasi di matrice, che possono idrolizzare le caseine (Le Roux, 2003). Di conseguenza la concentrazione di plasmina nel latte aumenta all'aumentare della SCC e

gioca un ruolo di primaria importanza nella proteolisi delle caseine (Kelly, O'Flaherty, & Fox, 2006)

## 1.6.2 Lattosio

Il lattosio è un componente sintetizzato nell'apparato di Golgi delle cellule secretorie della ghiandola mammaria partendo dal glucosio derivante dal circolo sanguigno (Schultz, 1977). La sintesi avviene mediante un complesso meccanismo al quale partecipano l'enzima galattosio-transferasi e l' $\alpha$ -lattoalbumina (Ebner & Schanbacher, 1974). In particolare l' $\alpha$ -lattoalbumina, una delle proteine del latte, interviene legandosi all'unità regolativa della lattosio sintetasi, permettendo all'enzima di legare l'UDP-galattosio al glucosio in modo tale da formare il lattosio (Sjaastad, Sand, & Hove, 2013).

Dopo la formazione, il lattosio viene mantenuto nelle vescicole secretorie a causa della differente pressione osmotica presente tra queste vescicole e il citoplasma cellulare. Questa differenza nella pressione osmotica funge da richiamo osmotico per importanti quantità di acqua che rispecchiano poi la quantità di latte prodotto. Se il glucosio (principale precursore per la sintesi di lattosio) ha una disponibilità limitata, la concentrazione di lattosio cala con effetti negativi sulla qualità e quantità di latte prodotto (Harmon, 1994).

Infezioni della ghiandola mammaria esitano in un danno tissutale e una minore capacità secretoria del sistema enzimatico presente nelle cellule secretorie (Kitchen, 1981; Harmon, 1994). Livelli di lattosio ridotti possono derivare anche da una minore disponibilità di glucosio nella ghiandola mammaria dovuta ad un ridotto apporto ematico conseguente ad una condizione di stress generalizzato concomitante a stati di malattia (Kitchen, 1981). Inoltre, come visto precedentemente, un'elevata SCC si ripercuote sull' $\alpha$ -lattoalbumina e, di conseguenza, una sua riduzione comporta una minore sintesi di lattosio durante la mastite (Haenlein, Schultz, & Zikakis, 1973).

### 1.6.3 Grassi

Un'elevata SCC si accompagna ad una riduzione nel contenuto di grassi anche del 10%, riduzione che però risulta essere inferiore rispetto a quella che si verifica per il lattosio e le caseine (circa del 15%), tuttavia la concentrazione percentuale può risultare anche aumentata qualora il calo di produzione lattea sia superiore al decremento nella sintesi del grasso (Schultz, 1977).

Oltre ad un calo nel contenuto totale di grassi, un'elevata SCC è associata anche a modificazioni nella loro composizione. Gli acidi grassi a corta catena e gli acidi grassi C18:1 (acido vaccenico) aumentano mentre gli acidi grassi C16:0 (acido palmitico) e C18:0 (acido stearico) diminuiscono (Randolph & Erwin, 1974). Altri autori hanno osservato che casi di mastite subclinica non presentano differenze nella composizione degli acidi grassi esterificati ma i casi clinici con  $SCC > 2\ 500\ 000$  cellule/ml presentano un significativo aumento nei livelli degli acidi grassi insaturi (Unsaturated Fatty Acids: UFA) (in particolare C16:1, C18:1, C18:2) (Kitchen, 1981) La spiegazione alla riduzione nel contenuto di grassi non è del tutto chiara, ma si pensa derivi da una ridotta sintesi imputabile al danneggiamento delle cellule secretorie (Schultz, 1977). Il contenuto in fosfolipidi risulta essere inferiore se aumenta la SCC mentre si osserva un incremento nell'attività delle lipasi e nel contenuto di acidi grassi liberi, questo perché il calo di fosfolipidi che costituiscono la membrana dei globuli di grasso riduce la protezione di questi ultimi nei confronti della lipolisi (Erwin & Randolph, 1975). Infatti anche il latte non mastitico contiene lipasi sufficienti a causare lipolisi ma il substrato è protetto dalla membrana dei globuli di grasso (Azzara & Dimick, 1985).

Per quanto riguarda invece le popolazioni all'interno della DSCC, è stato osservato che i macrofagi isolati dal latte possono secernere enzimi lipolitici (Azzara & Dimick, 1985). Inoltre la riduzione nel contenuto di fosfolipidi, associata ad una maggiore attività delle lipasi, suggerisce un ruolo importante di queste popolazioni che rispondono all'infiammazione nell'irrancidimento idrolitico del latte (Schultz, 1977).

### **1.6.4 Urea**

Risultati contrastanti sono riportati in letteratura per quanto riguarda l'associazione tra SCC e urea. Alcuni autori riportano reazioni positive (NG-Kwai-Hang, Hayes, Moxley, & Monardes, 1985; Yoon, Lee, Kim, Chung, & Kim, 2004), altri autori invece non hanno riscontrato associazioni significative tra il contenuto di urea del latte e la SCC (Eicher, Bouchard, & Brigas-Poulin, 1999). I risultati contrastanti ottenuti nei diversi studi possono essere dovuti a fattori limitanti intrinseci agli studi stessi, come il numero ridotto dei campioni o l'utilizzo di un unico sistema alimentare (all'interno dello stesso studio/allevamento).

A livello genetico Stoop et al. hanno individuato una correlazione genetica positiva di 0.85 tra SCC e contenuto di urea nel latte (Stoop, Bovenhuis, & van Arendonk, 2007).

## 2. Obiettivi

La variazione dei parametri produttivi e qualitativi del latte durante un evento mastitico è di importante interesse e il suo monitoraggio diventa strategico per il miglioramento dell'efficienza produttiva del settore lattiero-caseario. Ad oggi, molti lavori sono disponibili riguardo l'effetto della SCC mentre pochi sono gli studi che hanno proposto una valutazione più specifica in relazione alle DSCC.

Inoltre non sono presenti in bibliografia delle ricerche che abbiano analizzato l'effetto della DSCC sulla qualità e sulla produzione di latte.

Per questi motivi, l'obiettivo del presente studio è stato quello di individuare le modificazioni sia della composizione percentuale sia dei caratteri produttivi del latte nelle diverse classi di valori di DSCC e in combinazione con alti e bassi livelli di SCC. Contestualmente, sono state valutate altre fonti di variazione della qualità del latte, legate allo stadio di lattazione, all'ordine di parto dell'animale e all'allevamento di provenienza.

## 3. Materiali e metodi

### 3.1 Raccolta ed analisi dei campioni di latte

Un totale di 498 vacche provenienti da quattro allevamenti situati nella regione Lombardia sono state oggetto di campionamento. Per ognuna è stata registrata la produzione giornaliera di latte e sono stati raccolti campioni individuali durante la mungitura del mattino per l'analisi qualitativa del latte (da 3 a 15 osservazioni per vacca, per un totale di 4745 campioni). Le caratteristiche delle aziende agricole oggetto dello studio sono state precedentemente descritte da Zecconi et al. e riportate in tabella 4 (Zecconi, Vairani, Cipolla, Rizzi, & Zanini, 2019).

**Tabella 4 Caratteristiche degli allevamenti oggetto dello studio**

Fonte: Zecconi, Vairani, Cipolla, Rizzi, & Zanini, 2019

Allevamento	A	B	C	D
Media di vacche in lattazione	165	86	102	87
Razza	Holstein, Brown Swiss	Holstein	Holstein	Holstein, Simmental italiana
Sala di mungitura	Giostra	Robot di mungitura	Parallela	A lisca di pesce
Alimentazione	Razione unifeed	Foraggio ad libitum e concentrato con autoalimentatore	Razione unifeed	Razione unifeed
Destinazione del latte	Formaggio	Biologico	Latte alimentare	Formaggio
Produzione di latte media, kg/d	36.2	32.6	32.6	29.2
SCC media	178 000	206 000	373 000	239 000

I campioni di latte (privi di conservanti) sono stati refrigerati a 4 °C immediatamente dopo la raccolta e analizzati entro 24 ore dal campionamento utilizzando CombiFoss 7 (Foss Electric A / S, Hillerød, Danimarca). Il grasso, le proteine, le caseine, il lattosio, l'urea e la composizione degli acidi grassi liberi (Free Fatty Acids: FFA) del latte sono stati misurati utilizzando MilkoScan 7 (calibrato secondo ISO 9622 / IDF 141: 2013) mentre SCC e DSCC (PMN + linfociti, %) sono state determinate con Fossomatic 7DC (secondo gli standard ISO 13366-2 / IDF 148-2: 2006). La SCC è stata trasformata in scala logaritmica [ $\log_2(\text{SCC} \times 10^5) + 3$ ] nel punteggio delle cellule somatiche (Somatic Cell Score: SCS) secondo Ali e Shook, in maniera tale da avere una distribuzione lineare (Ali & Shook, 1980).

La produzione di latte e i tratti produttivi correlati (produzione di grasso, proteine, caseine e lattosio) sono stati ottenuti da un sottoinsieme di 390 animali (da 2 a 4 osservazioni per vacca, per un totale di 954 campioni), e sono state calcolate moltiplicando ciascuna componente percentuale del latte (divisa per 100) con la produzione giornaliera di latte (kg/d).

## 3.2 Analisi statistica

Due modelli statistici (procedura “mixed model”; SAS Institute Inc., Cary, NC) sono stati utilizzati per comprendere la capacità discriminatoria della DSCC come indicatore indiretto di modificazioni nella qualità del latte. In entrambi i modelli, la DSCC è stata inclusa come effetto fisso, costruendo 4 classi a partire dalla percentuale di 68.5% individuata da Zecconi et al. come valore soglia per l’identificazione di mastiti subcliniche sullo stesso dataset. A questo valore soglia, il test è risultato avere un’accuratezza di 0.816, con una sensibilità di 0.763 e una specificità di 0.831 (Zecconi, Vairani, Cipolla, Rizzi, & Zanini, 2019). Nel primo modello (M5), come classi intermedie, sono stati individuati i campioni di latte con valori di DSCC inferiori e superiori di 5% rispetto al valore soglia, mentre le due classi agli estremi includevano le code della distribuzione (classe 1: <63.5%; classe 2: 63.5%-68.5%; classe 3: 68.5%-73.5%; classe 4: >73.5%). Il secondo modello (M10) è stato costruito utilizzando come classi intermedie i campioni di latte con valori di DSCC superiori e inferiori di 10% rispetto al valore soglia (classe 1: <58.5%; classe 2: 58.5%-68.5%; classe 3: 68.5%-78.5%; classe 4: >78.5%). Entrambi i modelli (M5 e M10) includevano i seguenti effetti:

$$y_{mnopqrs} = \mu + \text{Herd}_m + \text{DIM}_n + \text{Parity}_o + \text{Animal}_p(\text{DIM}_n \text{ and Parity}_o) + \text{SCS}_q + \text{DSCC}_r + \text{SCS}_q \times \text{DSCC}_r + e_{mnopqrs}$$

dove:

$y_{mnopqrs}$  = è il tratto osservato (grasso, caseine, indice caseinico, lattosio, urea, SFA, UFA, MUFA e PUFA);

$\mu$  = è l’intercetta generale del modello;

$\text{Herd}_m$  = è l’effetto fisso dell’allevamento  $m^{\text{esimo}}$  ( $m$  = da 1 a 4)

$\text{DIM}_n$  = è l’effetto fisso della  $n^{\text{esima}}$  classe di giorni di lattazione [ $n$  = da 1 a 5; classe 1: 5-65 giorni (1,117 campioni); classe 2: 66-125 giorni (970 campioni); classe 3: 126-185

giorni (613 campioni); classe 4: 185-240 giorni (548 campioni); classe 5: >240 giorni (829 campioni)];

Parity<sub>o</sub> = è l'effetto fisso dell'<sup>esimo</sup> ordine di parto [o = da 1 a 4; classe 1: I parto (1,621 campioni); classe 2: II parto (1,542 campioni); classe 3: III parto (807 campioni); classe 4: ≥IV parto (775 campioni)];

Animal<sub>p</sub> = è l'effetto casuale del <sup>esimo</sup> (p = da 1 a 428) all'interno dell'<sup>esima</sup> classe di giorni di lattazione e dell'<sup>esimo</sup> ordine di parto;

SCS<sub>q</sub> = è l'effetto fisso della <sup>esima</sup> classe di SCS [q = da 1 a 2; classe 1: <5.00 (2,956 campioni); classe 2: ≥5.00 (1,789 campioni)];

DSCC<sub>r</sub> = è l'effetto fisso dell'<sup>esima</sup> classe di DSCC (come scritto precedentemente, le classi sono state costruite partendo dal valore soglia di 68.5% di DSCC);

SCS<sub>q</sub> × DSCC<sub>r</sub> = è l'effetto fisso dell'interazione tra la <sup>esima</sup> classe di SCS e l'<sup>esima</sup> classe di DSCC;

e<sub>mnpqrs</sub> = è l'errore casuale ~ N (0, ).

I contrasti ortogonali sono stati stimati tra le medie corrette delle componenti del latte per l'effetto della DSCC per entrambi i modelli M5 e M10:

- Campioni di latte prossimi al valore soglia (sia inferiori che superiori, classi 2+3) vs classe 1 di DSCC (valori più bassi).
- Campioni di latte con valori di DSCC prossimi al valore soglia (classe 2 vs classe 3).
- Campioni di latte prossimi al valore soglia (sia inferiori che superiori, classi 2+ 3) vs classe 4 di DSCC (valori più alti).

Per testare gli effetti della DSCC anche sui tratti produttivi (produzioni di latte, grasso, proteine, caseine e lattosio; sottoinsieme di 390 vacche), è stato utilizzato il seguente modello (M-produzioni):

$$y_{mnpqrs} = \mu + \text{Herd}_m + \text{DIM}_n + \text{Parity}_o + \text{Animal}_p(\text{DIM}_n \text{ and Parity}_o) + \text{SCS}_q + \text{DSCC}_r + \text{SCS}_q \times \text{DSCC}_r + e_{mnpqrs}$$

dove:

$y_{mnopqrs}$  = è il tratto osservato (produzione di latte, grasso, proteine, caseine e lattosio);

$\mu$  = intercetta generale del modello;

$Herd_m$  = è l'effetto fisso dell'allevamento  $m^{esimo}$  ( $m$  = da 1 a 4)

$DIM_n$  =  $p$  l'effetto fisso della  $n^{esima}$  classe di giorni di lattazione [ $n$  = da 1 a 5; classe 1: 5-65 giorni (223 campioni); classe 2: 66-125 giorni (200 campioni); classe 3: 126-185 giorni (133 campioni); classe 4: 185-240 giorni (119 campioni); classe 5: >240 giorni (155 campioni)];

$Parity_o$  = è l'effetto fisso dell' $o^{esimo}$  ordine di parto [ $o$  = da 1 a 4; classe 1: I parto (331 campioni); classe 2: II parto (291 campioni); classe 3: III parto (152 campioni); classe 4:  $\geq$ IV parto (180 campioni)];

$Animal_p$  = è l'effetto casuale del  $p^{esimo}$  ( $p$  = da 1 a 347) all'interno dell' $n^{esima}$  classe di giorni di lattazione e dell' $o^{esimo}$  ordine di parto;

$SCS_q$  = è l'effetto fisso della  $q^{esima}$  classe di SCS [ $q$  = da 1 a 2; classe 1: <5.00 (576 campioni); classe 2:  $\geq$ 5.00 (378 campioni)];

$DSCC_r$  = è l'effetto fisso dell' $r^{esima}$  classe di DSCC [ $r$  = da 1 a 2, classe 1 <68.5% (682 campioni); classe 2:  $\geq$ 68.5% (272 campioni)];

$SCS_q \times DSCC_r$  = è l'effetto fisso dell'interazione tra la  $q^{esima}$  classe di SCS e l' $r^{esima}$  classe di DSCC;

$e_{mnopqrs}$  = è l'errore casuale  $\sim N(0, \quad)$ .

Questi dati, nonostante i risultati riguardo unicamente la qualità del latte non siano stati mostrati nelle tabelle per questo modello, sono stati utilizzati per valutare le differenze tra valori più alti e più bassi rispetto al valore soglia di DSCC di 68.5%.

## 4. Risultati e discussione

### 4.1 Statistiche descrittive

In tabella 5 sono riportati i caratteri descrittivi della composizione chimica e i livelli produttivi del latte dei campioni presi in analisi. La produzione latte media delle vacche, in gran parte Holstein, oggetto dello studio è 32.1 kg/d con un discreto coefficiente di variazione (CV = 26%). Tale valore, superiore alla media registrata nel 2018 per le vacche di razza Holstein controllate in Italia (27.8 kg/d) (ANAFI, 2019), è comunque in linea con i dati riportati da Cassandro et al. (32.3 kg/d e CV = 32%) (Cassandro, et al., 2008). Anche per quanto riguarda le percentuali di grasso (4.10%) e proteine (3.55%) i dati raccolti mostrano performance produttive superiori alla media di razza registrata nel 2018 (3.76% e 3.35% rispettivamente) (ANAFI, 2019).

Tra i caratteri presi in analisi, quelli che hanno riportato la variabilità minore sono l'indice caseinico (78.5) e la concentrazione percentuale di lattosio (4.87%) (CV del 2% e 4% rispettivamente). Al contrario della concentrazione percentuale, la quantità totale di lattosio prodotta giornalmente presenta invece una buona variabilità (CV = 27%); così come le produzioni giornaliere degli altri componenti (grasso, proteine e caseine con CV di 30%, 25% e 25% rispettivamente), questo perché strettamente dipendenti dalla produzione di latte giornaliera. Tuttavia il tenore di grasso risente di una variabilità molto accentuata non solo per quanto riguarda la già citata produzione totale giornaliera, ma anche per la concentrazione percentuale (CV = 23%). Ciò è dovuto anche alla stretta correlazione esistente tra concentrazione di grasso e composizione della razione alimentare, condizionata quindi dal management delle diverse aziende di provenienza. Analogamente anche l'urea (23.4 mg/100g) presenta una variabilità importante (CV = 26%). La composizione degli acidi grassi presenta una scarsa variabilità per quanto riguarda gli acidi grassi saturi (CV = 6%) mentre gli acidi grassi insaturi si dimostrano molto più variabili sia

---

per quanto riguarda gli acidi grassi monoinsaturi (Mono Unsaturated Fatty Acid: MUFA) (CV = 15%) che per gli acidi grassi polinsaturi (Poli Unsaturated Fatty Acid: PUFA) (CV = 16%). Ciononostante i dati riscontrati per gli acidi grassi (SFA 68.7%, MUFA 26.8% e PUFA 4.49%) si avvicinano molto a quelli raccolti negli allevamenti della Lombardia dall'IZSLER di Brescia (SFA 69.2%, MUFA 27.6% e PUFA 3.73%) (Delle Donne, Marcolini, Zanardi, & Bolzoni, 2012).

**Tabella 5** Statistiche descrittive<sup>1</sup> dei componenti del latte, degli acidi grassi e dei campi produttivi dei campioni di latte presi in analisi

	Media	CV, %	P5 <sup>th</sup>	P95 <sup>th</sup>
<i>Componenti del latte</i>				
Grasso, %	4.10	23	2.50	5.62
Proteine, %	3.55	11	2.93	4.26
Caseine, %	2.79	12	2.27	3.38
Indice caseinico	78.5	2	76.2	80.6
Lattosio, %	4.87	4	4.51	5.16
Urea, mg/100g	23.4	26	14.0	33.9
<i>Acidi grassi, %</i>				
SFA	68.7	6	60.7	75.0
UFA	30.8	15	24.0	39.0
MUFA	26.8	15	21.2	34.1
PUFA	4.49	16	3.46	5.88
<i>Caratteristiche produttive<sup>2</sup>, kg/d</i>				
MY	32.1	26	18.5	45.8
FY	1.31	30	0.69	2.00
PY	1.12	25	0.67	1.59
CY	0.88	25	0.52	1.25
LY	1.58	27	0.91	2.31

<sup>1</sup>CV = coefficiente di variazione; P5<sup>th</sup> e P95<sup>th</sup> = indicano rispettivamente il primo 5% e l'ultimo 5% in un grafico della distribuzione dei dati per ciascuna variabile presa in considerazione

<sup>2</sup>MY = Produzione di latte; FY = produzione di grasso; PY = produzione di proteine; CY = produzione di caseina; LY = produzione di lattosio.

## 4.2 Effetto di SCS e DSCC sulle componenti qualitative del latte

In tabella 6 sono presentati i risultati relativi all'analisi della varianza nei modelli M5 e M10 per la composizione del latte e FFA. Il valore di F e la significatività sono risultati essere perfettamente sovrapponibili tra i due modelli M5 e M10 per quanto riguarda gli effetti di allevamento, giorni di lattazione e ordine di parto, perciò i risultati dell'ANOVA dei due modelli sono stati riassunti in un'unica tabella.

La proporzione della varianza dovuta all'animale è piuttosto elevata per tutte le componenti del latte anche se in generale tende a non superare il 50%. L'animale riveste un'importanza maggiore soprattutto per la concentrazione percentuale di proteine e caseine (effetto animale pari al 70% e 72% rispettivamente). Questo è un dato atteso poiché si tratta delle componenti del latte che presentano l'ereditarietà più elevata (Cassandro, et al., 2008) e pertanto risentono maggiormente dell'influenza dell'effetto animale.

L'allevamento di provenienza presenta una significatività importante per la varianza di tutti i parametri presi in esame ( $P < 0.001$ ), fatta eccezione per la concentrazione percentuale di lattosio. Tale dato potrebbe essere dovuto allo stretto legame che intercorre tra il lattosio e la fisiologia dell'attività secretoria della ghiandola mammaria, in particolare in relazione alla sua importanza nell'equilibrio osmotico necessario alla produzione del latte stesso (Kuhn, Carrick, & Wilde, 1980).

I giorni di lattazione (days in milk: DIM) sono un'altra variabile strettamente correlata a modificazioni importanti nella composizione del latte (Stanton, Jones, Everett, & Kachman, 1992; Wilmink, 1987). La significatività della varianza dovuta ai giorni di lattazione risulta essere notevole per tutti i componenti del latte ( $P < 0.001$ ), in particolare per la percentuale di proteine e di caseine, in accordo con quanto riportato da Ostersen et al. (Ostensen, Foldager, & Hermansen, 1997).

L'ordine di parto presenta una significatività importante nella varianza di indice caseinico, lattosio e acidi grassi (SFA, UFA e MUFA) ( $P < 0.001$ ). Concentrazione percentuale di

grasso e caseine invece non presentano una varianza molto significativa per l'ordine di parto, in accordo con Kelsey et al. (Kelsey, Corl, Collier, & Bauman, 2003).

Prendendo in considerazione il SCS, si osservano varianze molto significative per quanto riguarda il modello M5 per tutte le caratteristiche produttive, eccetto che per l'indice caseinico e la proporzione percentuale di UFA. Il SCS presenta una significatività analoga delle varianze anche nel modello M10 fatta eccezione per l'urea che, a differenza del modello M5, non presenta una varianza significativa nel modello M10.

La DSCC presenta, sia nel modello M5 sia nel modello M10, una significatività importante nella variazione del contenuto di grasso e di lattosio ( $P < 0.001$ ). La variazione di concentrazione di proteine e di caseine dovuta alla DSCC risulta essere leggermente significativa solo nel modello M10 ( $P < 0.05$ ), mentre i cambiamenti nel contenuto di urea e PUFA, pur avendo una significatività minore rispetto a grasso e lattosio, presentano importanza sia nel modello M5 sia nel modello M10 ( $P < 0.05$ ).

**Tabella 6 Analisi della varianza dei modelli<sup>1</sup> M5 e M10 per le componenti del latte e gli acidi grassi, con valore F e significatività per effetti fissi e proporzione della varianza (in percentuale) dovuta alla casualità dell'effetto animale**

	Effetti fissi, valore F e significatività										RMSE <sup>2</sup>
	Animale (%)	Allevamento	DIM	Ordine di parto	SCS		DSCC		SCS × DSCC		
					M5	M10	M5	M10	M5	M10	
<i>Componenti del latte</i>											
Grasso, %	44	39.4***	11.6***	3.4*	114.2***	87.0***	17.4***	15.0***	0.8	1.8	0.66
Proteine, %	70	72.6***	81.8***	2.2	34.1***	31.2***	1.7	3.6*	1.0	0.8	0.18
Caseine, %	72	70.8***	87.0***	3.3*	34.9***	30.6***	1.7	3.3*	1.2	0.5	0.14
Indice caseinico	45	17.8***	55.4***	19.9***	0.4	0.1	2.4	1.7	1.7	3.4**	0.89
Lattosio, %	58	1.3	17.4***	37.1***	225.5***	201.4***	9.3***	13.3***	5.4**	10.4***	0.11
Urea, mg/100g	34	107.2***	23.9***	4.8**	8.0**	3.1	5.8***	3.2*	1.7	3.4*	4.34
<i>Acidi grassi nel latte, %</i>											
SFA	50	226.4***	25.9***	10.4***	9.3**	10.8**	1.9	1.5	0.8	1.9	2.42
UFA	36	196.6***	24.2***	11.5***	2.8	3.1	2.6	2.4	1.1	1.5	3.00
MUFA	47	186.5***	26.9***	11.5***	16.0***	15.3***	2.4	1.6	1.0	1.7	2.30
PUFA	49	320.2***	11.5***	0.2	18.4***	9.3**	3.6*	2.7*	0.1	1.1	0.39

<sup>1</sup>Modello M5 = intervalli di DSCC, %: <63.5, 63.5-68.5, 68.5-73.5, >73.5; modello M10 = intervalli di DSCC, %: < 58.5, 58.5-68.5, 68.5-78.5, >78.5.

<sup>2</sup>RMSE= Radice dell'errore quadratico medio.

\*\*\* =  $P < 0.001$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \* =  $P < 0.05$ .

In figura 7 si vedono nello specifico gli effetti significativi dell'interazione  $SCS \times DSCC$  i cui valori F e relative significatività sono riportati anche in tabella 6.

Nella figura 7 ([a] e [b]) si osserva una correlazione positiva tra l'aumento della DSCC e il contenuto percentuale di lattosio nei campioni di latte con  $SCS < 5$ . Tale correlazione risulta essere positiva anche per  $SCS \geq 5$ , salvo poi presentare una flessione in corrispondenza di una  $DSCC > 73.5\%$  (figura 7 [a]) o  $> 78.5\%$  (figura 7 [b]). Prendendo in analisi le due diverse classi di SCS si nota però che i valori di lattosio sono minori in corrispondenza di un SCS superiore. Ciò risulta essere concorde con la bibliografia che descrive una correlazione negativa tra contenuto percentuale di lattosio e SCC (Harmon, 1994). È quindi interessante vedere che la DSCC presenta una correlazione opposta con il contenuto percentuale di lattosio rispetto a quella esistente tra quest'ultima e la SCC. Questo comportamento del lattosio potrebbe essere dovuto ad un iniziale aumento della concentrazione di glucosio all'interno della ghiandola mammaria dovuto ad un'aumentata richiesta energetica in corrispondenza delle prime fasi della mastite. Tale ipotesi è avvalorata dagli studi di Mochizuki et al. Essi riportano una maggiore espressione di GLUT-1 nei tessuti colpiti da processi infiammatori nei ratti da laboratorio anche se tale incremento risulta essere inferiore rispetto a quello osservato in tessuti tumorali (Mochizuki, et al., 2001). Ciò nonostante, non esistono studi in bibliografia che abbiano verificato questa over-espressione di trasportatori del glucosio nel tessuto ghiandolare mammario bovino. L'aumentata espressione del trasportatore specifico comporterebbe un aumentato apporto di glucosio proveniente dal torrente ematico a livello di ghiandola mammaria. Il glucosio è infatti il principale precursore del lattosio e rappresenta il vero fattore limitante all'attività della lattosio sintetasi (Kitchen, 1981).

Nel caso in cui i campioni di latte presentino un contenuto in  $SCS \geq 5$ , in corrispondenza di una  $DSCC > 73.5\%$  (figura 7 [a]) così come una  $DSCC > 78.5\%$  (figura 7 [b]), la percentuale di lattosio presenta una flessione. Questo dato potrebbe essere dovuto ad uno stato infiammatorio più avanzato dove l'attività proteolitica e ossidante dei PMN ha già determinato importanti danni tissutali a livello della ghiandola mammaria compromettendone le attività secretorie. Questo danno si ripercuoterebbe anche sulla lattosio sintetasi determinando, di conseguenza, un calo nella produzione di lattosio.

Nella figura 7 [c] è mostrato l'effetto dell'interazione SCS × DSCC sull'indice caseinico nel modello M10. In particolare si osserva che l'indice caseinico è negativamente associato con la DSCC sia per valori di  $SCS \geq 5$  sia con  $SCS < 5$ , salvo presentare un picco per valori di  $DSCC > 78.5$  nel gruppo di campioni con  $SCS < 5$ . Questo risultato potrebbe essere spiegato, in parte, dall'attività proteolitica dei diversi enzimi rilasciati principalmente dai PMN via via che la DSCC aumenta (Verdi & Barbano, 1991). Il trend osservato nella classe 4 di DSCC nei campioni di latte con  $SCS \geq 5$  è stato invece opposto. In generale, durante il processo infiammatorio, le componenti sintetizzate a livello di ghiandola mammaria ( $\alpha_s$ -caseina,  $\beta$ -caseina,  $\beta$ -lattoglobulina,  $\alpha$ -lattoalbumina) diminuiscono, mentre le componenti provenienti dal circolo sanguigno (principalmente immunoglobuline e albumine sieriche) aumentano (Schultz, 1977). Il costante declino osservato dopo il picco nell'indice caseinico dei campioni di latte con  $SCS \geq 5$  (figura 7 [c]) dovrebbe essere spiegato dalla ridotta funzionalità delle cellule epiteliali mammarie e dall'aumentata permeabilità della barriera emato-mammaria, in conseguenza al danno tissutale presente a livello di ghiandola mammaria (Ng-Kwai-Hang, Hayes, Moxley, & Monardes, 1984). Questo risultato è importante soprattutto se il latte è destinato alla produzione di formaggio, poiché un basso indice caseinico è associato a una peggiore capacità di coagulazione (Jõudu, Henno, Kaart, Püssa, & Kärt, 2008).

In bibliografia è riportato che il latte di vacche mastitiche presenta una concentrazione di caseina più bassa e un contenuto di azoto non proteico (che include l'urea) più alto rispetto al latte delle vacche sane (DePeters & Ferguson, 1992). Nella figura 7 [d] si osservano valori di urea superiori nella classe di  $SCS \geq 5$ . Dato atteso poiché la bibliografia riporta una correlazione positiva tra SCS e urea sia a livello fenotipico (Yoon, Lee, Kim, Chung, & Kim, 2004) che genotipico (correlazione genetica di 0.85) (Stoop, Bovenhuis, & van Arendonk, 2007). Il picco di urea che si osserva in figura 7 [d] per la classe 2 di DSCC con  $SCS \geq 5$  dovrebbe essere legato alla modifica dei profili di proteine e caseina che si verificano durante una risposta infiammatoria precoce. Al contrario, analizzando l'andamento del grafico per le diverse classi di DSCC ed escludendo il picco sopra descritto, si rileva una correlazione negativa tra urea e DSCC. Si rileva perciò un andamento opposto dell'urea in funzione della DSCC rispetto al SCS.

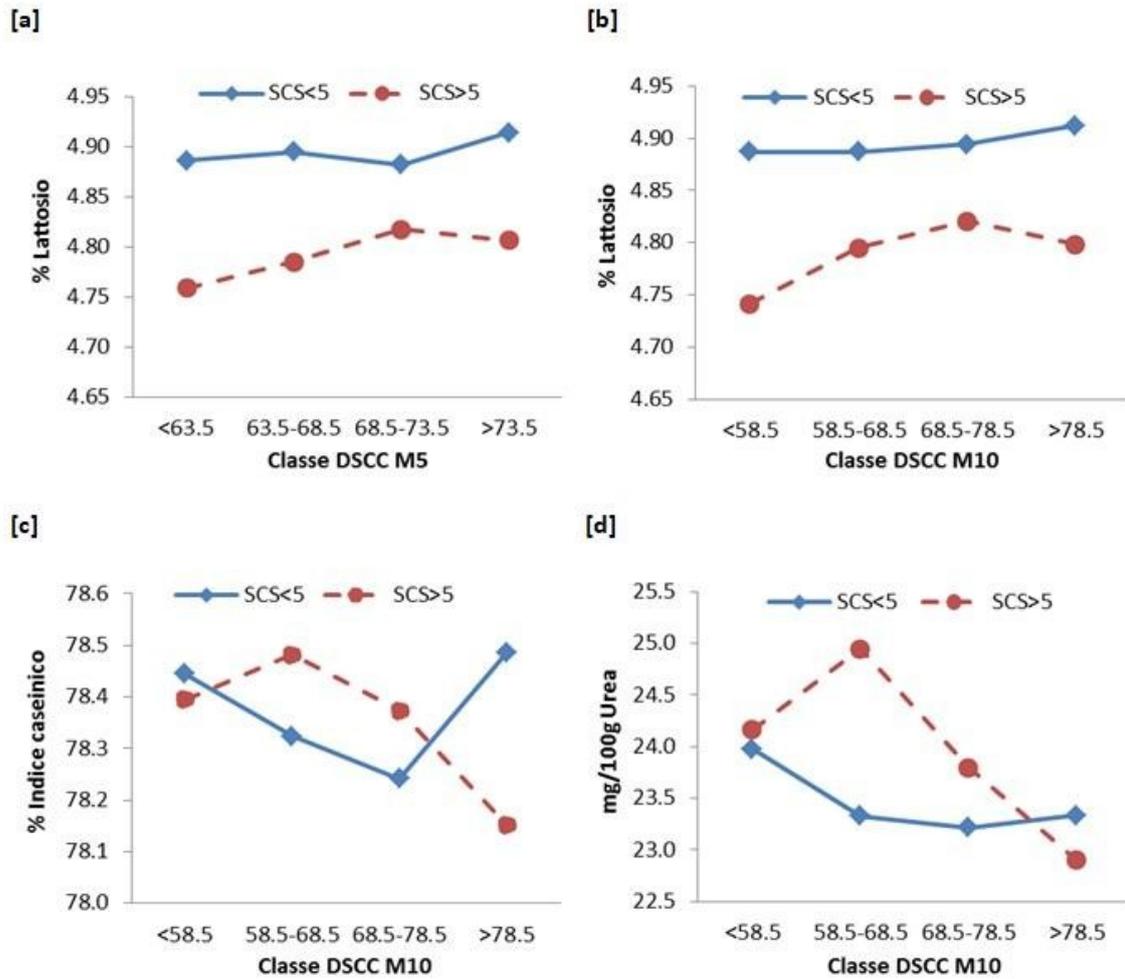


Figura 7 Effetto dell'interazione SCS × DSCC secondo il modello M5 su lattosio [a] ( $P < 0.05$ ), e SCS × DSCC secondo M10 su lattosio [b] ( $P < 0.01$ ), indice caseinico [c] ( $P < 0.001$ ) e urea [d] ( $P < 0.01$ )

## 4.3 Effetti significativi di SCS e DSCC sui caratteri produttivi

In tabella 7 è riportata l'analisi della varianza del modello produzioni per i caratteri produttivi e le medie corrette per i diversi intervalli di SCS ( $<5$  e  $\geq 5$ ) e DSCC ( $<68.5$  e  $\geq 68.5$ ). Come valori soglia sono stati utilizzati un SCS = 5 (pari ad una SCC = 400,000 cellule/ml) che corrisponde al limite massimo di cellule somatiche imposto in Unione Europea dai Regolamenti CE 853/2004 e 854/2004 per il latte crudo (Regolamento (CE) 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, 2004; Regolamento (CE) 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, 2004) e una DSCC = 68.5% che corrisponde al valore identificato da Zecconi come soglia discriminante tra mastite subclinica e ghiandola mammaria sana (Zecconi, Vairani, Cipolla, Rizzi, & Zanini, 2019).

La produzione di grasso espressa in kg/d, analogamente a quanto riportato in tabella 6 per la concentrazione percentuale di grasso, risente in maniera meno importante dell'effetto animale rispetto alle altre componenti (proporzione della varianza pari al 40%).

L'allevamento di provenienza presenta una significatività importante ( $P < 0.001$ ) per la varianza di tutti i caratteri produttivi presi in esame, sottolineando quanto la produzione sia influenzata dal management aziendale.

I giorni di lattazione (DIM) presentano una significatività elevata solo per la produzione di latte e di lattosio mentre l'ordine di parto risulta essere significativo per tutti i caratteri produttivi ( $P < 0.001$ ).

Analogamente ai DIM, anche il SCS risulta essere significativo solo per la varianza della produzione di latte e di lattosio. Questo probabilmente poiché il valore soglia preso in considerazione per il SCS è già piuttosto elevato considerato che, in bibliografia, si parla di mastite già in corrispondenza di valori di SCC di 200,000 cell/ml (Sharma, Singh, & Bhadwal, 2011) e quindi eventuali correlazioni con gli altri caratteri produttivi non presentano variazioni significative in corrispondenza del valore soglia utilizzato in questo studio.

L'effetto di DSCC è risultato essere significativo per la variazione di tutti i caratteri produttivi ( $P < 0.05$ ), fatta eccezione per la produzione di grasso. Interessanti sono soprattutto le medie corrette nei diversi intervalli di DSCC: tutti i caratteri produttivi presi in analisi presentano un andamento opposto rispetto a quello che si verifica per i diversi intervalli di SCS, in particolare la produzione di latte e di lattosio risultano essere significative in questo senso. Questo aspetto è evidenziato dal fatto che la varianza dovuta all'interazione  $SCS \times DSCC$  non risulta essere significativa per alcuno dei parametri produttivi.

**Tabella 7 Medie dei minimi quadrati per i diversi intervalli<sup>1</sup> di SCS e DSCC, e analisi della varianza del modello xx per i campi produttivi, con valore F e significatività per effetti fissi e proporzione della varianza (in percentuale) dovuta alla casualità dell'effetto animale**

Caratteristiche produttive <sup>2</sup> , kg/d	Effetti fissi, valore <i>F</i> e significatività											
	Animale (%)	Allevamento	DIM	Ordine di parto	SCS :	<5	≥5	DS CC:	<68.5	≥68.5	SCS × DS CC	RMSE <sup>3</sup>
						LS Ms	LS Ms		LS Ms	LS Ms		
MY	64	17.8***	12.4**	19.1**	7.2*	34.3	32.8	7.8*	32.8	34.3	0.5	4.25
FY	40	11.5***	1.7	10.0**	3.2	1.33	1.36	0.5	1.35	1.34	0.2	0.29
PY	59	33.9***	1.9	18.2**	2.7	1.17	1.15	6.5*	1.14	1.18	0.2	0.15
CY	59	35.6***	1.9	16.4**	2.9	0.92	0.90	6.2*	0.89	0.93	0.2	0.12
LY	65	13.1***	14.4**	14.9**	13.5***	1.70	1.58	5.6*	1.60	1.67	0.6	0.22

<sup>1</sup>Intervalli di SCS = <5, ≥5 ; Intervalli di DSCC, % = <68.5, ≥68.5.

<sup>2</sup>MY = produzione di latte; FY = produzione di grasso; PY = produzione di proteina; CY = produzione di caseina; LY = produzione di lattosio.

<sup>3</sup>RMSE= Radice dell'errore quadratico medio.

\*\*\* =  $P < 0.001$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \* =  $P < 0.05$ .

## 4.4 Contrasti ortogonali in funzione della DSCC

In tabella 8 sono riportate le medie corrette degli intervalli di DSCC secondo il modello M5 per le componenti del latte e gli acidi grassi, con la consistenza in termini di numero di campioni analizzati per ciascuna classe di DSCC. In tabella sono riportati anche il valore F e la significatività dei contrasti ortogonali per i diversi componenti del latte.

Il grasso presenta una significatività importante sia nel contrasto tra la classe di campioni prossimi al valore soglia vs la classe di campioni con DSCC più bassa ( $P < 0.01$ ), sia nel contrasto tra la classe di campioni prossimi al valore soglia vs la classe di campioni con DSCC più elevata ( $P < 0.001$ ). L'andamento della produzione percentuale di grasso in funzione della DSCC presenta un trend lineare negativo, come si vede in figura 8 [a] e come precedentemente illustrato in tabella 7 per la produzione di grasso (FY). Questo è un dato atteso poiché, come riporta Schultz, l'azione dei PMN può portare a danni tissutali tali da ridurre l'attività secretoria (Schultz, 1977). Inoltre Paape et al. riportano un'attività fagocitaria da parte dei PMN e dei macrofagi anche a discapito dei globuli di grasso (Paape, Wergin, & Guidry, 1981).

L'altro componente del latte che riporta modificazioni molto significative tra la classe di campioni prossimi al valore soglia vs la classe di campioni con DSCC più bassa è la concentrazione percentuale di lattosio ( $P < 0.001$ ). L'andamento di questo componente in funzione delle classi di DSCC presenta un'associazione positiva, come illustrato in figura 8 [b] e come già descritto in tabella 7 per la produzione di lattosio (LY). Tale dato, pur essendo in contrasto con l'effetto della SCC (Harmon, 1994), è in linea con quanto osservato precedentemente.

La variazione dell'urea nel latte risulta invece particolarmente significativa nel contrasto tra la classe di campioni prossimi al valore soglia vs la classe di campioni con DSCC più alta ( $P < 0.01$ ). Tale modificazione, come si vede in figura 8 [c], è descritta da un'associazione negativa con DSCC.

La composizione degli acidi grassi del latte presenta variazioni significative per le classi di DSCC più elevate ( $P < 0.05$ ). La componente percentuale di UFA presenta un incremento

significativo nel contrasto ortogonale tra le due classi di DSCC prossime al valore soglia ( $P < 0.05$ ) (figura 8 [d]). Questa variazione risulta essere concorde con quanto riportato in bibliografia, dove si descrive un aumento della percentuale di UFA in caso di mastiti (Kitchen, 1981). All'interno degli UFA si osservano però variazioni tra la percentuale di MUFA e di PUFA. In particolare nel contrasto tra la classe di campioni prossimi al valore soglia vs la classe di campioni con DSCC più elevata si osserva un aumento dei PUFA a discapito dei MUFA ( $P < 0.05$ ) (figura 8 [e] e figura 8 [f]).

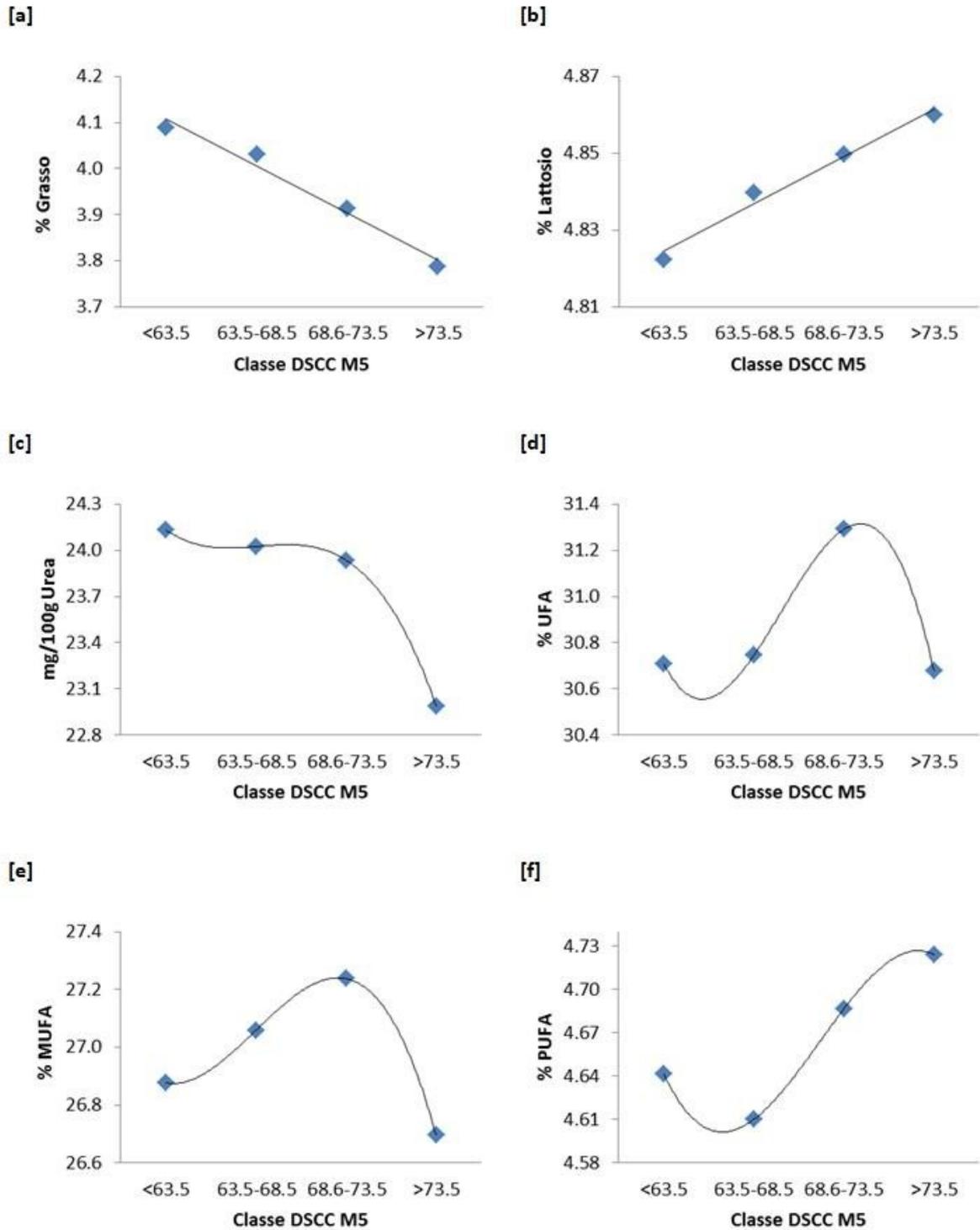
**Tabella 8 Least square means degli intervalli di DSCC secondo il modello M5<sup>1</sup> per le componenti del latte e gli acidi grassi, e i loro contrasti ortogonali (valore F e significatività)**

	DSCC (%), LSMeans				Contrasti, valore F e significatività		
	<63.5 (DSCC bassa)	63.5-68.5 (-5% DSCC)	68.6-73.5 (+5% DSCC)	>73.5 (DSCC alta)	±5% DSCC vs. DSCC bassa	-5% DSCC vs. +5% DSCC	±5% DSCC vs. DSCC alta
<b>N oss.</b>	<b>3041</b>	<b>392</b>	<b>403</b>	<b>909</b>			
<i>Componenti del latte</i>							
Grasso, %	4.09	4.03	3.91	3.79	10.0**	3.5	15.2***
Proteine, %	3.48	3.48	3.50	3.47	0.5	2.7	2.2
Caseine, %	2.73	2.73	2.75	2.72	0.2	2.1	2.7
Indice caseinico	78.4	78.4	78.3	78.3	0.9	2.5	1.6
Lattosio, %	4.82	4.84	4.85	4.86	11.9***	1.1	3.7
Urea, mg/100g	24.1	24.0	23.9	23.0	0.4	0.1	10.7**
<i>Acidi grassi del latte, %</i>							
SFA	68.5	68.3	68.1	68.6	3.1	1.1	3.7
UFA	30.7	30.7	31.3	30.7	2.9	4.1*	2.4
MUFA	26.9	27.1	27.2	26.7	3.2	0.6	5.8*
PUFA	4.64	4.61	4.69	4.72	0.1	3.8	5.4*

<sup>1</sup>Modello M5 = intervalli di DSCC, %: <63.5, 63.5-68.5, 68.5-73.5, >73.5.

\*\*\* =  $P < 0.001$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \* =  $P < 0.05$ .

**Figura 8** Andamento dei dati produttivi per le componenti del latte che presentano una variazione significativa in funzione delle classi di DSCC nel modello M5



In tabella 9 sono riportate le medie corrette degli intervalli di DSCC secondo il modello M10 per le componenti del latte e gli acidi grassi. Così come nel modello M5, anche qui il grasso presenta una significatività importante nei contrasti ortogonali. I contrasti più significativi sono tra la classe di campioni prossimi al valore soglia *vs* la classe di campioni con DSCC più bassa e tra le due classi prossime al valore soglia ( $P < 0.001$ ). Come illustrato in figura 9 [a], anche nel modello M10 si riconosce l'esistenza di un andamento lineare negativo tra concentrazione percentuale di grasso e l'aumento di DSCC.

Anche la concentrazione percentuale di lattosio dimostra nel modello M10 variazioni simili a quelle già riscontrate nel modello M5. Anche se in questo caso un range del  $\pm 10\%$  dalla soglia ha potuto evidenziare cambiamenti significativi nel contenuto di grasso dove un range del  $\pm 5\%$  non era stato in grado. Risultano significativi infatti i contrasti ortogonali tra la classe di campioni prossimi al valore soglia *vs* la classe di campioni con DSCC più bassa ( $P < 0.001$ ) e tra le due classi di campioni prossimi al valore soglia ( $P < 0.05$ ). In figura 9 [b] si evidenzia la correlazione lineare positiva già precedentemente descritta tra la concentrazione percentuale di lattosio e la DSCC.

Le concentrazioni percentuali di proteine e di caseine presentano una leggera significatività nei contrasti tra le due classi di campioni prossime al valore soglia e tra la classe di campioni prossimi al valore soglia *vs* la classe di campioni con DSCC più elevata ( $P < 0.05$ ). Tali variazioni riportano un andamento erratico (figura 9 [c] e figura 9 [d]). In particolare si osserva un leggero aumento della componente proteica per i campioni di classe 3 di DSCC rispetto ai campioni di classe 2 di DSCC. Tale componente, così come quella caseinica, riporta poi un calo significativo nei campioni della classe 4 di DSCC. Questi andamenti sono spiegabili dall'aumentato flusso di proteine sieriche provenienti dal circolo sanguigno e dall'attività proteolitica ad opera dei PMN in seguito al processo infiammatorio (Schultz, 1977).

La variazione dell'urea nel latte risulta invece particolarmente significativa nel contrasto tra le due classi di campioni prossimi al valore soglia ( $P < 0.05$ ). Tale variazione, come si vede in figura 9 [e], è dovuta ad una correlazione negativa tra DSCC e contenuto di urea nel latte.

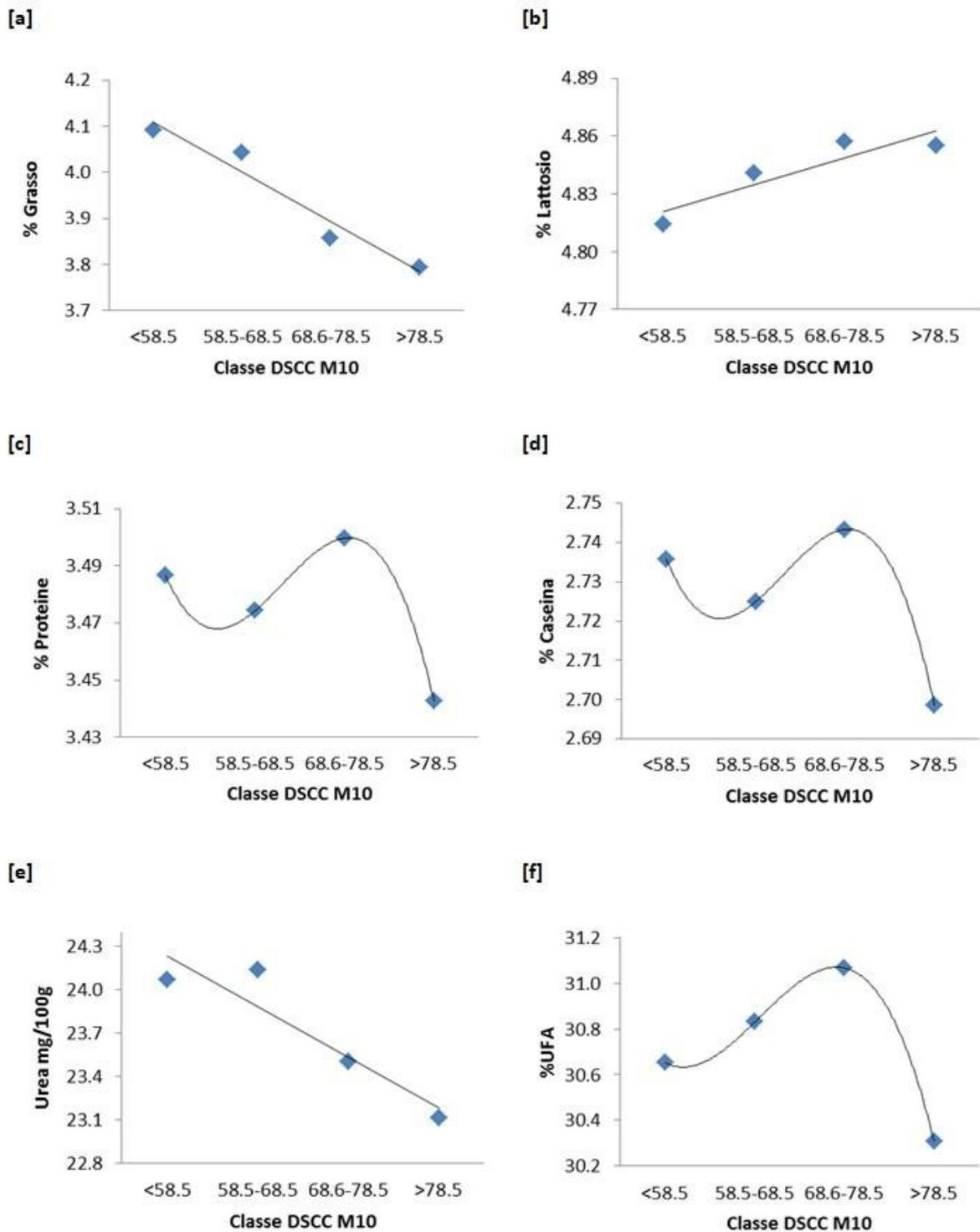
La composizione degli acidi grassi del latte presenta variazioni significative per le classi di DSCC più elevate ( $P < 0.05$ ). La componente percentuale di UFA presenta un decremento significativo nel contrasto ortogonale tra la classe di campioni prossimi al valore soglia vs la classe di campioni con DSCC più alta ( $P < 0.05$ ) anche se nelle classi con DSCC più bassa sembra esserci una correlazione positiva tra DSCC e la percentuale UFA (figura 9 [f]). All'interno degli UFA si osserva però un incremento significativo dei PUFA nel contrasto tra le due classi di DSCC prossime al valore soglia ( $P < 0.01$ ).

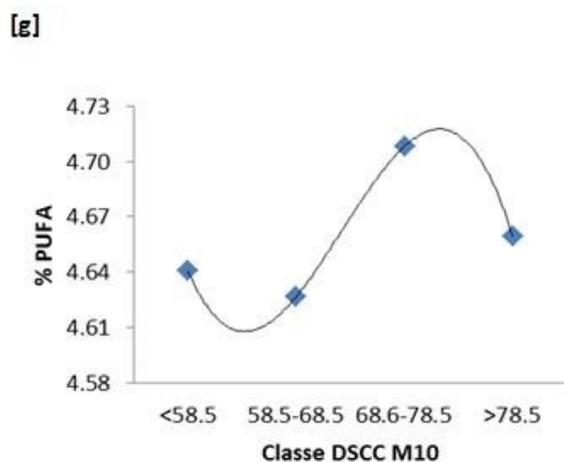
**Tabella 9** Media dei minimi quadrati degli intervalli di DSCC secondo il modello M10<sup>1</sup> per le componenti del latte e gli acidi grassi, e i loro contrasti ortogonali (valore F e significatività)

	DSCC (%), LSMeans				Contrasti, valore F e significatività		
	<58.5 (DSCC bassa)	58.5-68.5 (-10% DSCC)	68.6-78.5 (+10% DSCC)	>78.5 (DSCC alta)	±10% DSCC vs. DSCC bassa	-10% DSCC vs. +10% DSCC	±10% DSCC vs. DSCC alta
<b>N oss.</b>	<b>2609</b>	<b>824</b>	<b>759</b>	<b>553</b>			
<i>Componenti del latte</i>							
Grasso, %	4.09	4.04	3.86	3.79	18.9 <sup>***</sup>	11.7 <sup>***</sup>	5.2 <sup>*</sup>
Proteine, %	3.49	3.47	3.50	3.44	0.0	4.5 <sup>*</sup>	5.7 <sup>*</sup>
Caseina, %	2.74	2.72	2.74	2.70	0.1	3.5	5.5 <sup>*</sup>
Indice caseinico	78.4	78.4	78.3	78.3	2.8	2.6	0.2
Lattosio, %	4.81	4.84	4.86	4.86	34.0 <sup>***</sup>	5.1 <sup>*</sup>	0.3
Urea, mg/100g	24.1	24.1	23.5	23.1	1.5	5.0 <sup>*</sup>	2.6
<i>Acidi grassi del latte, %</i>							
SFA	68.5	68.4	68.3	68.8	1.9	0.2	3.3
UFA	30.7	30.8	31.1	30.3	3.2	1.3	4.0 <sup>*</sup>
MUFA	26.8	27.0	27.0	26.5	1.9	0.0	3.6
PUFA	4.64	4.63	4.71	4.66	1.2	7.4 <sup>**</sup>	0.0

<sup>1</sup>Modello M10 = intervalli di DSCC, %: < 58.5, 58.5-68.5, 68.5-78.5, >78.5.  
<sup>\*\*\*</sup> =  $P < 0.001$ ; <sup>\*\*</sup> =  $P < 0.01$ ; <sup>\*</sup> =  $P < 0.05$ .

**Figura 9** Andamento dei dati produttivi per le componenti del latte che presentano variazioni significative in funzione delle classi di DSCC nel modello M10





In tabella 10 sono riportati i risultati ottenuti dai contrasti ortogonali nel modello M5 e nel modello M10. Si rilevano risultati analoghi per quanto riguarda il contenuto percentuale di grasso e di lattosio, sottolineando un andamento simile a prescindere dall'ampiezza dei range di riferimento. Per queste due componenti, anche confrontando la figura 8 e la figura 9, si può parlare di un'associazione negativa tra DSCC e contenuto percentuale di grasso e positiva tra DSCC e concentrazione percentuale di lattosio. Così come per il contenuto di urea, che sembra diminuire nel latte quando la concentrazione di DSCC è elevata (in entrambi i modelli).

Le concentrazioni percentuali di proteine e di caseine risultano essere significative solo nel modello M10. La significatività della variazione è leggera e si riscontra solo nei contrasti con classi di DSCC più elevate ( $P < 0.05$ ). Questo dato sottolinea il ruolo dei leucociti, in particolare dei PMN, nella proteolisi delle caseine. Questa proteolisi risulta essere significativa soprattutto quando il contenuto di PMN all'interno della ghiandola mammaria è molto elevato (e quindi anche la DSCC è elevata).

Per quanto riguarda gli acidi grassi, sono state osservate variazioni significative solo per il gruppo UFA. Nel modello M5 questo gruppo di acidi grassi è stato influenzato dall'aumento di DSCC in corrispondenza del valore soglia, mentre nel modello M10 le classi con DSCC più elevata risultano essere maggiormente significative per questi acidi grassi. Nel modello M5 sia i MUFA che i PUFA hanno presentato variazioni significative.

Nel modello M10 solo i PUFA sono stati influenzati da DSCC, e in corrispondenza del valore soglia.

**Tabella 10 Valore F e significatività dei contrasti ortogonali con la media dei minimi quadrati degli intervalli di DSCC secondo il modello<sup>1</sup> M5 e M10 per le componenti del latte e gli acidi grassi**

Modello	Contrasti, valore <i>F</i> e significatività					
	M5			M10		
Contrasti ortogonali	±5% DSCC vs. DSCC bassa	-5% DSCC vs. +5% DSCC	±5% DSCC vs. DSCC alta	±10% DSCC vs. DSCC bassa	-10% DSCC vs. +10% DSCC	±10% DSCC vs. DSCC alta
<i>Componenti del latte</i>						
Grasso	10.0 <sup>**</sup>	3.5	15.2 <sup>***</sup>	18.9 <sup>***</sup>	11.7 <sup>***</sup>	5.2 <sup>*</sup>
Proteine	0.5	2.7	2.2	0.0	4.5 <sup>*</sup>	5.7 <sup>*</sup>
Caseine	0.2	2.1	2.7	0.1	3.5	5.5 <sup>*</sup>
Indice caseinico	0.9	2.5	1.6	2.8	2.6	0.2
Lattosio	11.9 <sup>***</sup>	1.1	3.7	34.0 <sup>***</sup>	5.1 <sup>*</sup>	0.3
Urea	0.4	0.1	10.7 <sup>**</sup>	1.5	5.0 <sup>*</sup>	2.6
<i>Acidi grassi del latte</i>						
SFA	3.1	1.1	3.7	1.9	0.2	3.3
UFA	2.9	4.1 <sup>*</sup>	2.4	3.2	1.3	4.0 <sup>*</sup>
MUFA	3.2	0.6	5.8 <sup>*</sup>	1.9	0.0	3.6
PUFA	0.1	3.8	5.4 <sup>*</sup>	1.2	7.4 <sup>**</sup>	0.0

<sup>1</sup>Modello M5 = intervalli di DSCC, %: <63.5, 63.5-68.5, 68.5-73.5, >73.5; modello M10 = intervalli di DSCC, %: <58.5, 58.5-68.5, 68.5-78.5, >78.5.

\*\*\* =  $P < 0.001$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \* =  $P < 0.05$ .

## 5. Conclusioni

Il presente lavoro ha voluto studiare l'effetto della DSCC sulla qualità e sulla produzione del latte bovino. Finora la DSCC era stata considerata solo come parametro utile ai fini diagnostici, riconoscendone le potenzialità soprattutto in vista di un protocollo per la messa in asciutta selettiva.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti, la DSCC ha evidenziato risvolti molto interessanti sui parametri qualitativi dei campioni di latte analizzati. Al contrario di quello che si osserva per la SCC, questo indicatore di mastite presenta associazioni positive con la componente percentuale di lattosio del latte e con la produzione di latte giornaliera. Questo, oltre a suggerire un ruolo nella modulazione della risposta immunitaria di questo componente del latte, potrebbe indicare la maggiore propensione delle bovine più produttive alle infezioni della mammella.

Ciò nonostante, la produzione giornaliera di grasso e la concentrazione percentuale del grasso nel latte risentono già delle basse DSCC, che sono quindi informative del processo infiammatorio in atto. Le differenze riportate tra SCC e DSCC nella correlazione con la qualità del latte possono essere dovute al fatto che la SCC possa essere legata ad un processo infiammatorio sia acuto che cronico mentre la DSCC indica più precisamente un processo infiammatorio acuto, dove la famiglia leucocitaria più rappresentata è quella dei PMN.

Questa sperimentazione si presenta come il primo approccio di studio riguardo i risvolti della DSCC sui parametri produttivi e qualitativi del latte.

Per ottenere risultati più accurati, si suggeriscono ulteriori campionamenti in più allevamenti per evidenziare in dettaglio le fonti di variazione considerate. Inoltre sarebbe interessante capire come la DSCC possa influenzare le proprietà di coagulazione del latte e la resa casearia. Ulteriori studi sono necessari riguardo l'integrazione di questa informazione con metodiche diagnostiche di tipo diretto quali colture batteriologiche e

PCR sul latte individuale, con l'obiettivo di considerare la variazione della DSCC in funzione di infezioni mammarie già diagnosticate mediante il "gold standard". Interessante potrebbe essere anche uno studio svolto sui singoli quarti in maniera tale da evitare qualsivoglia tipo di effetto diluizione.

## 6. Bibliografia

Ali, A. K., & Shook, G. E. (1980). An optimum transformation for somatic cell concentration in milk. *Journal of Dairy Science* 63 , 487-490.

ANAFI. (2019). *Medie Produzioni Latte/Grasso/Proteine Vacche Razza Frisone Controllate*. Tratto il giorno Luglio 10, 2019 da <http://www.anafi.it/>

Anderson, M., & Andrews, A. T. (1977). Progressive changes in individual milk protein concentrations associated with high somatic cell counts. *Journal of Dairy Research* 44 , 223-235.

Auldust, M. J., & Hubble, I. B. (1998). Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Australian Journal of Dairy Science* 53 , 28-36.

Azzara, C. D., & Dimick, P. S. (1985). Lipoprotein lipase activity of milk from cows with prolonged subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 68 , 3171-3175.

Ballou, L. U., Pasquini, M., Bremel, R. D., Everson, T., & Sommer, D. (1995). Factors affecting herd milk composition and milk plasmin at four levels of somatic cell counts. *Journal of dairy science* 78 , 2186-2195.

Barone, R. (2009). *Anatomia comparata dei mammiferi domestici, Volume IV Splancnologia Apparecchio uro-genitale, feto e suoi annessi, peritoneo e topografia addominale*. Milano: Edagricole.

Bastian, E. D., & Brown, R. J. (1996). Plasmin in milk and dairy products: an update. *International Dairy Journal* 6 , 435-457.

Berry, E. A., Hogeveen, H., & Hillerton, J. (2004). Decision tree analysis to evaluate dry cow strategies. *J. Dairy Res.* 71 , 409-418.

- 
- Bertoni, G., Trevisi, E., Han, X., & Bionaz, M. (2008). Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 91 , 3300-3310.
- Bobbo, T., Cipolat-Gotet, C., Bittante, G., & Cecchinato, A. (2016). The nonlinear effect of somatic cell count on milk composition, coagulation properties, curd firmness modeling, cheese yield, and curd nutrient recovery. *Journal of Dairy Science* 99 , 5104-5119.
- Bobbo, T., Fiore, E., Giancesella, M., Morgante, M., Gallo, L., Ruegg, P. L., et al. (2017). Variation in blood serum proteins and association with somatic cell count in dairy cattle from multi-breed herds. *Animal* 11 , 2309-2319.
- Bobbo, T., Penasa, M., & Cassandro, M. (2019). Short communication: Genetic aspects of milk differential somatic cell count in Holstein cows: A preliminary analysis. *Journal of Dairy Science* 102 , 1-5.
- Bortree, A. L., Carroll, E. J., & Schalm, O. W. (1962). Whey protein patterns of milk from cows with experimentally produced mastitis. *Journal of Dairy Science* 45 , 1465-1471.
- Bradley, A. (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *The veterinary journal* , 1-13.
- Bruckmaier, R. M., Ontsouka, C. E., & Blum, J. W. (2004). Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. *Vet. Med.* 49 , 283–290 .
- Bruckmaier, R., & Wellnitz, O. (2017). Pathogen-specific immune response and changes in the blood-milk barrier of the bovine mammary gland. *J.Anim.Sci.* 95 , 5720-5728.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J., & Griffiths, E. (1978). The role of iron in bacterial infection. *Curr. Top. Microb. Immunol.* , 80:1.
- Burvenich, C., Guidry, A., Capuco, A., & Paape, M. (1996). The influence of neutrophils and systemic diseases on bovine mastitis during early lactation. In J. Blum, & M. Bruckmaier, *Milk synthesis, secretion and removal in ruminants* (p. 123-130). Berne: Universitu of Berne.
-

- 
- Capuco, A. V., Bright, S. A., Pankey, J. W., Wood, D. L., Miller, R. H., & Bitman, J. (1992). Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *Journal of dairy science* 75 , 2126.
- Capuco, A. V., Paape, M. J., & Nickerson, S. C. (1986). In vitro study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissue of lactating cows. *Am. J. Vet. Res.* , 47: 663.
- Cassandro, M., Comin, A., Ojala, M., Dal Zotto, R., De Marchi, M., Gallo, L., et al. (2008). Genetic parameters of milk coagulation properties and their relationships with milk yield and quality traits in Italian Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 91 , 371-376.
- Chandran, R. C., Shahani, K. M., & Holly, K. G. (1964). Lysozyme content of human milk. *Nature* , 204:688.
- Coulon, J. B., Gasqui, P., Barnouin, J., Ollier, A., Pradel, P., & Pomiès, D. (2002). Effect of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally-occurring udder infections in dairy cows. *Animal Res.* 51 , 383-393.
- Cullen, G. A. (1968). Cell counts throughout lactation-physiological variation in cell count of cows milk during lactation. *Veterinary Record* 83 , 125-128.
- Cullen, G. A. (1966). Cells in milk. *Veterinary Bulletin* 36 , 337-346.
- Dang, A. K., Suman, K., Charan, S., & Sehgal, J. P. (2008). Milk differential cell counts and compositional changes in cows during different physiological stages. *Milchwissenschaft* 63 , 239-242.
- Delle Donne, G., Marcolini, A., Zanardi, G., & Bolzoni, G. (2012). Rapporto tra acidi grassi saturi e insaturi nel latte bovino. *Informatore zootecnico* 19 , p. 91-97.
- DePeters, E. J., & Ferguson, J. D. (1992). Nonprotein Nitrogen and Protein Distribution in the Milk of Cows. *Journal of Dairy Science* 75 , 3192-3209.
- Detilleux, J., Koehler, K., Freeman, A., Kehrli, M., & Kelley, D. (1994). Immunological parameters of periparturient Holstein cattle: Genetic variation. *Journal of Dairy Science* , 77: 2640-2645.
-

- 
- Ebner, K. E., & Schanbacher, F. L. (1974). In K. E. Ebner, & F. L. Schanbacher, *Lactation, a comprehensive treatise, vol.2* (p. 77-113). New York: Academic Press: Ed. B. L. Larson and V.R. Smith.
- Eicher, R., Bouchard, E., & Brigas-Poulin, M. (1999). Factors affecting milk urea nitrogen and protein concentrations in Quebec dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* 39 , 53-63.
- Erwin, R. E., & Randolph, H. E. (1975). Influence of mastitis on properties of milk. XI. Fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 58 , 9-12.
- Fitzpatrick, J. L., Cripps, P. J., Hill, A. W., Bland, P. W., & Stokes, C. R. (1992). MHC class II expression in bovine mammary gland . *Vet. Immunol. Immunopathol.* , 32: 13.
- Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., & Kaltsatos, V. (2001). Bovine mastitis and intramammary drug delivery review and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews* 50 , 245-259.
- Guidry, A. J., O'Brien, C. N., & Douglass, L. W. (1998). A bovine mammary endothelial/epithelial cell culture model of the blood/milk barrier. *Canadian journal of veterinary research* 62 , 117-121.
- Haenlein, G., Schultz, H., & Zikakis, J. P. (1973). Composition of protein in milk with varying leukocyte content. *Journal of Dairy Science* 56 , 1017-1024.
- Harmon, R. J. (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science* 77 , 2103-2112.
- Hibbitt, K. G., Cole, C. B., & Reiter, B. (1969). Antimicrobial proteins isolated from the teat canal of the cow. *J. Gen. Microbiol.* 56 , 365.
- Hillerton, J. E., & Berry, E. A. (2005). Treating mastitis in the cow- a tradition or an archaism. *J. Appl. Microbiol.* 98 , 1250-1255.
- Howard, C. J., Taylor, G., & Brownlie, J. (1980). Surface receptors for immunoglobulin on bovine polymorphonuclear neutrophils and macrophages. *Res. Vet. Sci.* , 29:128.
-

- 
- Huijps, K., Lam, T. J., & Hogeveen, H. (2008). Costs of mastitis: facts and perception. *Journal of Dairy Research* 75 , 113-120.
- Jensen, D. L., & Eberhart, R. J. (1981). Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. *Am. J. Vet. Res.* , 42: 743.
- Jõudu, I., Henno, M., Kaart, T., Püssa, T., & Kärt, O. (2008). The effect of milk protein contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. *International Dairy Journal* 18 , 964-967.
- Kelly, A. L., O'Flaherty, F., & Fox, P. F. (2006). Indigenous proteolytic enzymes in milk: a brief overview of the present stage of knowledge. *International Dairy Journal* 16 , 563-572.
- Kelsey, J. A., Corl, B. A., Collier, R. J., & Bauman, D. E. (2003). The Effect of Breed, Parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86 , 2588-2597.
- Kiddy, C. A., Groves, M. L., McCann, R. E., & Treece, J. M. (1968). Effect of udder inflammation on electrophoretic pattern of cow's milk protein. *J. Dairy Sci.* 51 , 954.
- Kitchen, B. J. (1981). Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research* 48 , 167-188.
- Klei, L., Yun, J., Sapru, A., Lynch, J., Barbano, D. M., Sears, P., et al. (1998). Effects of milk somatic cell count on Cottage cheese yield and quality. *Journal of Dairy Science* 81 , 1205-1213.
- Kuhn, N. J., Carrick, D. T., & Wilde, C. J. (1980). Symposium: milk synthesis - Lactose synthesis: the possibilities of regulation. *Journal of Dairy Science* 63 , 328-336.
- Le Maréchal, C., Thiéry, R., Vautor, E., & Le Loir, Y. (2011). Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products - a review. *Dairy Science and Technology* 91 , 247-282.
- Le Roux, Y. (2003). Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. *Veterinary Research* 34 , 629-645.
-

- 
- Le Roux, Y., Colin, O., & Laurent, F. (1995). Proteolysis in samples of quarte milk with varying somatic cell counts. 1. Comparison of some indicators of endogenous protolysis in milk. *Journal of Dairy Science* 78 , 1289-1297.
- Lescourret, F., & Coulon, J. B. (1994). Modelling the impact of mastitis on milk production by dairy cows. *Journal of dairy Science* 77 , 2289-2301.
- Li, N., Richoux, R., Boutinaud, M., Martin, P., & Gagnaire, V. (2014). Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. *Dairy Sci. & Techol.* 94 , 517-538.
- Licata, E. (1985). Subclinical mastitis and urea determination in cows' milk. *Obiett. Doc. Vet.* 6 , 65-67.
- Lohuis, J., Verheijdon, J., Burvenich, C., & Van Miert, A. (1988). Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants. II. Metabolic aspects. *Vet. Q.* , 10:117.
- Magnuson, N. S., Spies, A. G., Nissen, M. S., Buck, C. D., Weinberg, A. D., Barr, P. J., et al. (1987). Bovine interleukin-2; regulatory mechanisms. *Vet. Immunol. Immunopathol.* , 17:183.
- Mani, O., Sorensen, M. T., Sejrsen, K., Bruckmaier†, R. M., & Albrecht, C. (2009). Differential expression and localization of lipid transporters in the bovine mammary gland during the pregnancy-lactation cycle. *Journal of Dairy Science* 92 , 3744-3756.
- Mazal, G., Vianna, P. C., Santos, M. V., & Gigante, M. L. (2007). Effect of somatic cell count on Prato cheese composition. *Journal of Dairy Science* 90 , 630-636.
- McGavin, M. D., & Zachary, J. F. (2008). *Patologia generale veterinaria IV Edizione*. Milano: Elsevier Masson.
- McInerney, J. P., Howe, K. S., & Schepers, J. A. (1992). A framework for the economic analysis of disease in farm livestock. *Prev. Vet. Med.* 13 , 137-154.
- Mehrzad, J., & Zhao, X. (2008). T lymphocyte proliferative capacity and CD4+/CD8+ ratio in primiparous and pluriparous lactating cows. *Journal of Dairy Research* , 75: 457-465.
-

- 
- Mochizuki, T., Tsukamoto, E., Kuge, Y., Kanegae, K., Zhao, S., Hikosaka, K., et al. (2001). FDG Uptake and Glucose Transporter Subtype Expressions in Experimental Tumor and Inflammation Models. *The Journal of Nuclear Medicine* , 1551-1555.
- Monesi, V. (2012). *Istologia VI edizione*. Padova: Piccin.
- Murphy, J. M., & Stuart, O. M. (1953). The effect of introducing small numbers of *Streptococcus agalactiae* (Cornell Strain 48) directly into the bovine teat cavity. *Cornell Vet* 43 , 290.
- Musoke, A. J., Rurangirwa, F. R., & Nantulya, V. M. (1987). Biological properties of bovine immunoglobulins and systemic antibody responses. In W. I. Morrison, *The ruminant immune system in health and disease* (p. 393). Cambridge: Cambridge University Press.
- Naitana, S., Nuvole, P., & Marongiu, A. (1992). Lattazione. In G. Aguggini, V. Beghelli, & L. F. Giulio, *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia* (p. 781-808). Torino: UTET.
- Neville, M. C., McFadden, T. B., & Forsyt, I. (2002). M.C.Neville, T. M. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* , 49-66.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., Hayes, J. F., Moxley, J. E., & Monardes, H. G. (1985). Percentages of Protein and Nonprotein Nitrogen with Varying Fat and Somatic Cells in Bovine Milk. *Journal of Dairy Science* 68 , 1257-1262.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., Hayes, J. F., Moxley, J. E., & Monardes, H. G. (1984). Variability of test-day milk production and composition and relation of somatic cell counts with yield and compositional changes of bovine milk . *Journal of Dairy Science* 67 , 361-366.
- Nyman, A., Persson Waller, K., Bennedsgaard, T., Larsen, T., & Emanuelson, U. (2014). Associations of udder-health indicators with cow factors and with intramammary infection in dairy cows. *Journal of Dairy Science* , 97: 5459-5473.
-

- 
- Ogola, H., Shitandi, A., & Nanua, J. (2007). Effect of mastitis on raw milk compositional quality. *Journal of Veterinary Science* 8 , 237-242.
- Ostenssen, K. (1993). Variations during lactation in total and differential leukocyte counts, N-acetyl-B-D-glucosaminidase, antitrypsin and serum albumin in foremilk and residual milk from non-infected quarters in the bovine. *Acta Veterinaria Scandinavia* 34 , 83-93.
- Ostensen, S., Foldager, J., & Hermansen, J. E. (1997). Effects of stage of lactation, milk protein genotype and body condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk. *Journal of Dairy Research* 64 , 207-219.
- Outteridge, P. M., & Lee, C. S. (1988). The defense mechanisms of the mammary gland of domestic ruminants. *Prog. Vet. Microbiol. Immun.* , 4:165.
- Paape, M. J., Wergin, W. P., & Guidry, A. J. (1981). Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* , 137: 555.
- Paape, M., & Guidry, A. (1977). Effect of fat and casein on intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by milk leukocytes. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* , 155: 588-593.
- Paape, M., & Guidry, A. (1969). Effect of milking on leukocytes in the subcutaneous abdominal vein of the cow. *Journal of Dairy Science* , 52: 998-1002.
- Paape, M., Mehrzad, J., Zhao, X., Detilleux, J., & Burvenich, C. (Aprile 2002). Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of mammary gland biology and neoplasia, Vol VII, No. 2* , 109-121.
- Persson, K., Sandgren, C. H., & Rodriguez-Martinez, H. (1992). Studies of endotoxin-induced neutrophil migration in bovine teat tissues using indium-III-labeled neutrophils and biopsies. *Am. J. Vet. Res.* , 53: 2235.
- Pickering, K. E. (1995). *Decision analysis as an aid for monitoring mastitis*. MSc Thesis. University of Aberdeen. Department of Agriculture.
- Randolph, H. E., & Erwin, E. R. (1974). Influence of mastitis on properties of milk. X. Fatty acid composition. *J. Dairy Sci.* 57 , 865-868.
-

---

Regolamento (CE) 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio. (2004). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* .

Regolamento (CE) 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio. (2004). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* .

Reiter, B., & Oram, J. D. (s.d.). Bacterial inhibitors in milk and other biological fluids. *Nature* , 216:328.

Renner, E. (1975). *Bulletin, International Dairy Federation (Document no. 85)* , 53-58.

Rupp, R., Boichard, D., Bertrand, C., & Bazin, S. (2000). Overview of milk somatic cell counts in the French dairy cattle breeds. *Prod. Anim.* 13 , 257-267.

Sali, G. (1980). Indirizzi terapeutici pratici nel controllo delle principali forme di mastite bovina. *XII congresso nazionale SIB*, (p. 119-138).

Schalm, O. W., Carroll, E. J., & Jain, N. C. (1971). *Bovine mastitis*. Philadelphia, Pennsylvania: Lea & Febiger.

Schultz, L. H. (1977). Somatic cells in milk-physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. *Journal of food protection* 40 , 125-131.

Schwarz, D. (2018). Differential somatic cell count - A new biomarker for mastitis screening. *ICAR Technical Series no. 21* (p. 105-112). Hilleroed: ICAR Proceedings.

Schwarz, D. (2018). The new CombiFoss 7 DC. Differential somatic cell count and other advancements in milk testing . *ICAR Technical Series No. 22* (p. 41-47). Roma: ICAR Proceedings.

Schwarz, D. (2018). The new CombiFoss<sup>TM</sup> 7 DC- An update on differential somatic cell count and other advancements in milk testing. *ICAR Technical Series No. 23* (p. 119-125). Roma: ICAR Proceedings.

Schwarz, D., Diesterbeck, U. S., S.König, S., Brügemann, K., Schlez, K., Zschöck, M., et al. (2011). D. Schwarz, U. D. (2011, ottobre). Flow cytometric differential cell counts in

---

milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science* , 5033-5044.

Seegers, H., Fourichon, C., & Beaudeau, F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary research* 34 , 475-491.

Sharma, N., Singh, N. K., & Bhadwal, M. S. (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. *Asian-Australian Journal of Animal Science* 24 , 429-438.

Shennan, D. B., & Peaker, M. (2000). Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiological Reviews* , 927-928.

(2013). La lattazione. In O. V. Sjaastad, O. Sand, & K. Hove, *Fisiologia degli animali domestici* (p. 740-747). Milano: Casa Editrice Ambrosina.

Sjaastad, V. (2013). *Fisiologia degli animali domestici*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana.

Smith, K. L., & Oliver, S. P. (1981). Lactoferrin: a component of nonspecific defense of the involuting bovine mammary gland. In J. E. Butler, *The Ruminant Immune System* (p. 535). New York: Plenum Press.

Sordillo, L. M., Nickerson, S. C., Akers, R. M., & Oliver, S. P. (1987). Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. *Int. J. Biochem.* , 19: 1165.

Sordillo, L. M., Redmond, M. J., Campos, M., Warren, L., & Babiuk, L. A. (1991). Cytokine activity in the bovine mammary gland secretions during the periparturient period. *CAn. J. Vet. Res.* , 55:298.

Sordillo, L. M., Shafer-Weaver, K., & DeRosa, D. (1997). Symposium: bovine immunology- Immunobiology of the mammary gland. *Journal of dairy science* 80 , 1851-1865.

Stanton, T. L., Jones, L. R., Everett, R. W., & Kachman, S. D. (1992). Estimating milk, fat, and protein lactation curves with a test day model. *Journal of Dairy Science* 75 , 1691-1700.

---

- 
- Stelwagen, K., & Singh, K. (2014). The role of tight junctions in mammary gland function. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 19 , 131-138.
- Stoop, W. M., Bovenhuis, H., & van Arendonk, J. A. (2007). Genetic parameters for milk urea nitrogen in relation to milk production traits. *Journal of Dairy Science* 90 , 1981-1986.
- Summer, A., Formaggioni, P., Franceschi, P., Malacarne, M., & Mariani, P. (2003). Proteose-peptone content in the milk of Italian Fresian cows with moderate and high somatic cell values. *Italian Journal of Animal Science* 2 (Suppl. 1) , 266-298.
- Taylor, B. C., Dellinger, J. D., Cullor, J. S., & Scott, J. L. (1994). Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+. *Cell. Immunol.* , 156:245.
- Treece, J. M., Morse, G. E., & Levy, C. (1966). Lipid analyses of bovine teat canal keratin. *Journal of dairy science* 49 , 1240.
- Trevisi, E., Zecconi, A., Cogrossi, S., Razzuoli, E., Grossi, P., & Amadori, M. (2014). Strategies for reduced antibiotic usage in dairy cattle farms. *Research in veterinary science* 96 , 229-233.
- Urech, E., Puhan, Z., & Schallibaum, M. (1999). Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 82 , 2402-2411.
- Verdi, R. J., & Barbano, D. M. (1991). Properties of Proteases from Milk Somatic Cells and Blood Leukocytes. *Journal of Dairy Science* 74 , 2077-2081.
- Viguiet, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., & O'Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnology* 27 , 486-493.
- Wellnitz, O., Zbinden, C., Huang, X., & Bruckmaier, R. M. (2016). Differential loss of bovine mammary epithelial barrier integrity in response to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Journal of Dairy Science* 99 , 4851-4856.
-

- 
- Wheelock, J. V., Rook, J. A., Neave, F. K., & Dodd, F. H. (1966). The effect of bacterial infections of the udder on the yield and composition of cow's milk. *Journal of Dairy Research* 33 , 199-215.
- Wickstrom, E., Perrson-Waller, K., Lindmark-Mansson, H., Ostensson, K., & Sternesjo, A. (2009). Relationship between somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte count and quality parameters in bovine bulk tank milk. *Journal of dairy research* 76 , 195-201.
- Wilmink, J. B. (1987). Adjustment of test-day milk, fat and protein yield for age, season and stage of lactation. *Livestock Production Science* 16 , 335-348.
- Yalcin, C. (2000). Cost of mastitis in Scottish dairy herds with low and high sub-clinical mastitis problems. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 24 , 465-472.
- Yoon, J. T., Lee, J. H., Kim, C. K., Chung, Y. C., & Kim, C. H. (2004). Effects of milk production, season, parity and lactation period on variations of milk urea nitrogen concentration and milk components of Holstein dairy cows. *Asian-Australian Journal of Animal Science* 17 , 479-484.
- Zecconi, A. (2007). Le cellule somatiche nel latte. *L'informatore agrario, agosto* , 66-70.
- Zecconi, A., Vairani, D., Cipolla, M., Rizzi, N., & Zanini, L. (2019). Assessment of subclinical mastitis diagnostic accuracy by differential cell count in individual cow milk. *Italian Journal of Animal science* Vol18, no.1 , 460-465.
- Zhao, F. Q. (2014). Biology of glucose transport in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* , 3-17.
- Zhao, X., & Lacasse, P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. *Journal of animal science* , 57-65.
-

## 7. Iconografia

### FIGURE

- Figura 1** *Rappresentazione schematica dell'alveolo mammario* .....  
 Fonte: Naitana, S., Nuvole, P., & Marongiu, A. (1992). Lattazione. In G. Aguggini, V. Beghelli, & L. F. Giulio, *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia* (p. 781-808). Torino: UTET. .... 8
- Figura 2** *Modificazioni endocrine legate al parto e all'inizio della produzione di latte nella vacca* .....  
 Fonte: Sjaastad, V. (2013). *Fisiologia degli animali domestici*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana ..... 10
- Figura 3** *Diagramma riassuntivo delle principali vie di secrezione attraverso l'epitelio mammario* .....  
 Fonte: Sjaastad, V. (2013). *Fisiologia degli animali domestici*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana ..... 12
- Figura 4** *Peso percentuale costi derivanti dalla mastite* .....  
 Fonte: Pickering, K. E. (1995). *Decision analysis as an aid for monitoring mastitis*. MSc Thesis. University of Aberdeen. Department of Agriculture... 17
- Figura 5** *Rappresentazione schematica dello sviluppo di una mastite in una mammella infetta* .....  
 Fonte: Viguier, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., & O'Kennedy, R. (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnology* 27 , 486-493 ..... 24

---

**Figura 6** *Diagramma schematico dell'evoluzione della SCC e della composizione cellulare del latte in corso di mastite* .....

Fonte: Schwarz, D. (2018). Differential somatic cell count - A new biomarker for mastitis screening. *ICAR Technical Series no. 21* (p. 105-112). Hilleroed: ICAR Proceedings ..... 34

**Figura 7** *Effetto dell'interazione SCS × DSCC secondo il modello M5 su lattosio [a] ( $P < 0.05$ ), e SCS × DSCC secondo M10 su lattosio [b] ( $P < 0.01$ ), indice caseinico [c] ( $P < 0.001$ ), e urea [d] ( $P < 0.01$ )* Elaborazione propria ..... 54

**Figura 8** *Andamento dei dati produttivi per le componenti del latte che presentano una variazione significativa in funzione delle classi di DSCC nel modello M5* Elaborazione propria ..... 60

**Figura 9** *Andamento dei dati produttivi per le componenti del latte che presentano variazioni significative in funzione delle classi di DSCC nel modello M10* Elaborazione propria ..... 63

**TABELLE**

**Tabella 1** *Peso percentuale dei diversi costi causati dalla mastite stimati in diversi studi* .....

Fonte: Pickering, K. E. (1995). Decision analysis as an aid for monitoring mastitis. MSc Thesis. University of Aberdeen. Department of Agriculture... 19

**Tabella 2** *Riassunto dei principali test diagnostici che sfruttano indicatori di mastite nel latte* .....

Fonte: Kitchen, B. J. (1981). Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research* 48 , 167-188 ..... 22

**Tabella 3** *Caratteristiche e composizione delle cellule somatiche di una ghiandola mammaria sana* .....

Fonte: Li, N., Richoux, R., Boutinaud, M., Martin, P., & Gagnaire, V. (2014). Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. *Dairy Sci. & Techol.* 94 , 517-538 ..... 32

**Tabella 4** *Caratteristiche degli allevamenti oggetto dello studio* .....

Fonte: Zecconi, A., Vairani, D., Cipolla, M., Rizzi, N., & Zanini, L. (2019). Assessment of subclinical mastitis diagnostic accuracy by differential cell count in individual cow milk. *Italian Journal of Animal science* Vol18, no.1 , 460-465 ..... 42

**Tabella 5** *Statistiche descrittive dei componenti del latte, degli acidi grassi e dei campi produttivi dei campioni di latte presi in analisi* Elaborazione propria .....

**Tabella 6** *Analisi della varianza dei modelli M5 e M10 per le componenti del latte e gli acidi grassi, con valore F e significatività per effetti fissi e*

---

*proporzione della varianza (in percentuale) dovuta alla casualità dell'effetto animale* Elaborazione propria ..... 51

**Tabella 7** *Medie dei minimi quadrati per i diversi intervalli di SCS e DSCC, e analisi della varianza del modello xx per i campi produttivi, con valore F e significatività per effetti fissi e proporzione della varianza (in percentuale) dovuta alla casualità dell'effetto animale* Elaborazione propria ..... 57

**Tabella 8** *Least square means degli intervalli di DSCC secondo il modello M5 per le componenti del latte e gli acidi grassi, e i loro contrasti ortogonali (valore F e significatività)* Elaborazione propria ..... 59

**Tabella 9** *Media dei minimi quadrati degli intervalli di DSCC secondo il modello M10 per le componenti del latte e gli acidi grassi, e i loro contrasti ortogonali (valore F e significatività)* Elaborazione propria ..... 62

**Tabella 10** *Valore F e significatività dei contrasti ortogonali con la media dei minimi quadrati degli intervalli di DSCC secondo il modello M5 e M10 per le componenti del latte e gli acidi grass* Elaborazione propria ..... 65